

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata usando extracto de hojas de *Ambrosia arborescens* (marco) como reductor químico

Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias Químicas con mención
en Química Analítica

FLAVIA NATALIA DOMENECH GORDILLO

Quito, 2017

CERTIFICACIÓN

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Químicas con mención en Química Analítica, de la Srta. Flavia Natalia Domenech Gordillo ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Fecha:

Firma del Director de la Disertación

Mtr. María Fernanda Pilaquinga

A todos aquellos que se dejan fascinar por la química

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por ser siempre mi apoyo y mi motivación en todo momento.

A la Universidad Católica por todo el conocimiento e interés infundido tanto académico como profesional.

A mi directora de tesis, Mtr. María Fernanda Pilaquinga por darme la oportunidad de explorar la Nanotecnología.

A la Escuela de Ciencias Químicas por la disponibilidad de uso de los laboratorios y equipos.

A NanoInstrumentos por permitirme llevar a cabo los ensayos SEM y a todos los que hicieron posible esta investigación.

A todos los profesores que me impulsaron durante la carrera, a mis amigos y compañeros que compartieron este camino y esta pasión. Nathy y Danny, a ustedes un especial agradecimiento por la ayuda tanto académica como personal.

TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
TABLA DE CONTENIDOS	v
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ANEXOS	xii
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
CAPÍTULO I	7
1. MARCO TEÓRICO	7
1.1. HISTORIA DE LA NANOCIENCIA	7
1.2. NANOTECNOLOGÍA	8
1.3. NANOPARTÍCULAS METÁLICAS	10
1.4. NANOPARTÍCULAS DE PLATA	11
1.4.1. APLICACIONES	12
1.4.2. TOXICIDAD	14

1.4.3. MÉTODOS DE SÍNTESIS	16
1.5. PLANTA DE MARCO (Ambrosia arborescens).....	19
CAPÍTULO II.....	22
2. MATERIALES Y MÉTODOS	22
2.1. PREPARACIÓN DE EXTRACTO	22
2.2. OPTIMIZACIÓN DE LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA	22
2.3. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA	23
2.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA	24
2.4.1. ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS	24
2.4.1.1. INSTRUMENTACIÓN	27
2.4.1.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS	28
2.4.2. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJOS.....	28
2.4.2.1. INSTRUMENTACIÓN	32
2.4.2.2. ANÁLISIS DE MUESTRAS.....	32
2.4.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM).....	33
2.4.3.1. INSTRUMENTACIÓN	35
2.4.3.2. ANÁLISIS DE MUESTRAS.....	36
2.5. ESPECTROFOTOMETRÍA ABSORCIÓN ATÓMICA DE LLAMA PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PLATA	36

2.5.1. INSTRUMENTACIÓN.....	39
2.5.2. ANÁLISIS DE MUESTRAS	39
2.5.3. EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DEL MÉTODO	39
2.5.3.1. LINEALIDAD	40
2.5.3.2. PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN	41
2.5.3.3. LÍMITE DE DETECCIÓN Y DE CUANTIFICACIÓN.....	42
CAPÍTULO III	43
3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
3.1. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO	43
3.2. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA.....	43
3.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA.....	44
3.3.1. ESPECTROSCOPIA UV-VIS	44
3.3.1.1. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRATO DE PLATA	45
3.3.1.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA	46
3.3.1.3. EFECTO DEL TIEMPO.....	47
3.3.1.4. EFECTO DEL pH.....	48
3.3.1.5. EFECTO DE LA CANTIDAD DE EXTRACTO	50
3.3.1.6. ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA.....	51

3.3.2. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJOS POR TRANSFORMADAS DE FOURIER

53

3.3.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)..... 57

3.4. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA DE LLAMA 61

3.4.1. EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DEL MÉTODO 62

3.4.1.1. LINEALIDAD 62

3.4.1.2. RECUPERACIÓN 63

3.4.1.3. LÍMITE DE DETECCIÓN Y DE CUANTIFICACIÓN 64

3.4.2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PLATA DE LAS SÍNTESIS 66

CAPÍTULO IV 68

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 68

4.1. CONCLUSIONES 68

4.2. RECOMENDACIONES 69

BIBLIOGRAFÍA 71

ANEXOS 87

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1. Condiciones de prueba para la optimización de síntesis	23
Tabla 3.1. Valores de máxima absorbancia para las repeticiones de la síntesis de nanopartículas de plata	52
Tabla 3.2. Análisis elemental SEM-EDX de las nanopartículas sintetizadas	60
Tabla 3.3. Datos de absorbancia y concentración para el cálculo de porcentajes de recuperación para la fortificación de plata de concentración 1,00 ppm	63
Tabla 3.4. Datos de absorbancia y concentración para el cálculo de porcentajes de recuperación para la fortificación de plata de concentración de 4,00 ppm	64
Tabla 3.5. Lecturas de absorbancia de los blancos y concentraciones calculadas para la determinación de LOD y LOQ	65
Tabla 3.6. Datos para el cálculo del rendimiento de la reacción	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Esquema de los métodos bottom up y top down [9]	9
Figura 1.2. Proceso de formación de nanopartículas de plata a partir de una sal	17
Figura 1.3. Hoja de la planta de marco	20
Figura 1.4. 3',4',5,7-tetrahidroxi-3,6,8-trimetoxi flavona (a) y limocitrin (b)	21
Figura 2.1. Espectrofotómetro UV-Vis: diagrama de un instrumento de simple haz (a) y diagrama de un instrumento de doble haz (b)	26
Figura 2.2. Tipos de vibraciones en una molécula simple causadas por la radiación IR	29
Figura 2.3. Diagrama de un equipo FTIR	31
Figura 2.4. Diagrama básico de un equipo SEM	35
Figura 2.5. Diagrama de un espectrómetro de absorción atómica	37
Figura 3.1. Extracto de marco con nitrato de plata antes (a) y después (b) de la formación de nanopartículas	44
Figura 3.2. Espectros UV de nanopartículas de plata para la variación de concentraciones de AgNO_3	46
Figura 3.3. Espectros UV de nanopartículas de plata para la variación de temperatura	47
Figura 3.4. Espectros UV de las nanopartículas de plata para la variación del tiempo.....	48
Figura 3.5. Espectros UV de nanopartículas de plata para la variación del pH	50
Figura 3.6. Espectros UV de nanopartículas de plata para la variación de la cantidad de extracto	51
Figura 3.7. Ejemplo de espectro UV de la síntesis de nanopartículas de plata	53

Figura 3.8. Espectros FTIR de: nitrato de plata (a), extracto de marco (b) y nanopartículas de plata sintetizadas con extracto de marco (c).....	54
Figura 3.9. Reacción de síntesis de nanopartículas con pentaeritritol	56
Figura 3.10. Prueba de cloruro férrico para polifenoles: extracto de marco (a) y nanopartículas sintetizadas (b).....	56
Figura 3.11. Imagen SEM de las nanopartículas sintetizadas	58
Figura 3.12. Imagen del área para el análisis elemental SEM-EDX	59
Figura 3.13. Espectro EDX de las nanopartículas sintetizadas	60
Figura 3.14. Curva de calibración de plata para la cuantificación del contenido de plata de las nanopartículas.....	62

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Equipos utilizados en la caracterización de las nanopartículas	87
Anexo 2. Espectros UV de las síntesis optimizadas de nanopartículas de plata	89
Anexo 3. Cálculo del rendimiento de la reacción química de síntesis de nanopartículas	91

RESUMEN

En el presente trabajo se sintetizaron nanopartículas de plata por el método de reducción química usando como agente reductor el extracto acuoso de las hojas de *Ambrosia arborescens*, también conocida como “marco”. Para el proceso adecuado de síntesis, se optimizó el método propuesto variando los siguientes parámetros: concentración de nitrato de plata (0,1; 0,5; 1,0; 5,0 y 10,0 mM), temperatura (40, 45, 50, 55 y 60°C), tiempo de reacción (10, 20, 30, 40, 50 min), pH (7, 8, 9, 10 y 11) y la cantidad de extracto vegetal de concentración 0,05 g/mL (1,0; 1,5; 2,0; 2,5 y 3,0 mL). Los parámetros óptimos de síntesis se dieron al emplear una solución de AgNO₃ 1.0 mM, con temperatura de 50°C por 50 minutos a pH 8 utilizando 2 mL de extracto acuoso de planta de marco. Para la caracterización de las nanopartículas, se realizaron análisis por espectrofotometría UV-Vis y Microscopía Electrónica de Barrido con detector de Rayos X (SEM-EDX). Se obtuvieron nanopartículas esféricas, con tendencia a la agregación y tamaño promedio de 63 nm. Por Espectroscopia de Infrarrojos con Transformadas de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés), se comprobó el adecuado recubrimiento de las nanopartículas con el extracto de la planta. Además, el análisis elemental de la muestra mediante SEM-EDX, mostró la presencia de elementos tales como carbono y oxígeno en gran proporción, y plata únicamente en un 0,9%, sugiriendo un adecuado recubrimiento con el extracto. Para comprobar la presencia de plata en las nanopartículas preparadas, se determinó su contenido por Espectroscopía de Absorción Atómica de Llama (AA). Como resultado no se

encontraron pérdidas del elemento, antes y después de la reacción en concentración de 98,01 ppm y 90,73 ppm respectivamente, equivalente a un rendimiento del 92.52%.

Palabras clave: Nanopartículas de plata, marco (*Ambrosia arborescens*), UV-Vis, FTIR, SEM, AAS.

ABSTRACT

The aim of this study was to synthesize silver nanoparticles by chemical reduction method using ragweed aqueous extract (*Ambrosia arborescens*) as a reducing agent. Synthesis method was optimized by changing parameters like silver nitrate concentration (0,1; 0,5; 1,0; 5,0 y 10,0 mM), temperature (40, 45, 50, 55 y 60°C), time (10, 20, 30, 40, 50 min), pH (7, 8, 9, 10 y 11) and extract volume of 0,05 g/mL (1,0; 1,5; 2,0; 2,5 y 3,0 mL). Optimal conditions were at temperature of 50°C during 50 minutes, a pH of 8, 2 mL of extract and a 1mM solution of AgNO₃. For the characterization of synthesized nanoparticles several techniques were employed. UV-Vis spectroscopy analysis was made to monitor the formation of silver nanoparticles by the presence of a peak of maximal absorbance at 415 nm which estimates a particle size between 30 and 50 nm. Infrared Spectroscopy (FTIR) analysis proved a successful nanoparticle covering with the plant extract. Through Scanning Electron Microscope (SEM) morphology, aggregation and size particles were observed. It was found that silver nanoparticles have a spherical shape, with great aggregation and a size of 63 nm. Elemental analysis executed with an X-Ray detector (SEM-EDX) showed a high percentage of carbon and oxygen and a 0.9% of silver, suggesting an acceptable covering. To test the presence of silver in obtained nanoparticles, its content was determined by Atomic Absorption Spectrometry (AAS). As a result, there was a significant recovery of silver, before the reaction (98,01 ppm) and once the silver nanoparticles were synthesized (90,73 ppm), equivalent to a reaction yield of 92,52%.

Key words: Silver nanoparticles, ragweed (*Ambrosia arborescens*), UV-Vis, FTIR, SEM, AAS.

INTRODUCCIÓN

La nanotecnología es una ciencia en crecimiento que comprende procesos de síntesis, caracterización y manipulación de partículas de tamaños entre 1 y 100 nm. La principal ventaja de las partículas de este tamaño son sus propiedades físicas, químicas y biológicas [1]. Entre las nanopartículas más utilizadas, se encuentran aquellas compuestas de metales preciosos como oro o plata. Los metales, en escala nanométrica, tienen propiedades ópticas, electrónicas, catalíticas, magnéticas, entre otras, que difieren notablemente de las que se presentan en los mismos materiales a mayor escala; estas propiedades están directamente relacionadas con el tamaño, la forma, la composición, la estructura y la morfología de la nanopartícula metálica [2]. Su uso se vuelve común debido a que las nanopartículas actúan como agentes antivirales y antibacteriales [3]. Diversos estudios han demostrado que las nanopartículas de plata no solo tienen aplicaciones en la medicina, sino también en la industrial textil, cosmética y alimenticia, incluso se ha llegado a proponer que las nanopartículas de plata son la próxima generación de agentes antimicrobianos [4].

Existen distintos métodos para la síntesis de nanopartículas de plata ya sean físicos o químicos. El método más común para sintetizarlas es la reducción de una sal metálica de plata, esto implica utilizar un agente reductor que puede provocar daños al ambiente y a la salud humana [1]. Por esta razón, la química verde propone sustituir los reactivos químicos utilizados como reductores por extractos naturales de plantas. En este trabajo se describe la síntesis de nanopartículas de plata utilizando extracto acuoso de hojas de marco (*Ambrosia*

arborescens) con el fin de comprobar su capacidad como agente reductor. También se pretende optimizar dicha síntesis y posteriormente caracterizar las nanopartículas obtenidas.

A continuación, se presenta la distribución del trabajo para un mejor entendimiento del mismo. En el Capítulo I se encuentran conceptos generales de relacionados con la nanotecnología, así como los métodos de síntesis, propiedades y aplicaciones de las nanopartículas de plata. Además, las principales características de la planta de marco, utilizada para la reacción de síntesis.

En el Capítulo II se presenta la metodología utilizada para la preparación del extracto y la optimización de la síntesis de nanopartículas de plata. De igual manera, se describen las técnicas usadas para la caracterización de las nanopartículas obtenidas, como Espectrofotometría UV-Vis, Espectroscopía de Infrarrojos con Transformadas de Fourier (FTIR) y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Por último, se detalla la Espectroscopía de Absorción Atómica (AAS) para la cuantificación del contenido de plata de las síntesis realizadas.

En el Capítulo III se exponen los resultados obtenidos en el estudio con la discusión correspondiente.

Finalmente, en el Capítulo IV se mencionan las conclusiones y recomendaciones para el trabajo realizado.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. HISTORIA DE LA NANOCIENCIA

Si bien la Nanociencia se empieza a denominar de esta manera a partir del siglo XX, existen evidencias de que desde aproximadamente el año 2700 A.C., en China ya se utilizaba tinta que contenía nanopartículas de carbono en agua [5].

Otro caso muy puntual de la nanotecnología utilizada en la antigüedad es la copa de *Licurgo*. Esta pieza de arte romano data del siglo XV, sin embargo, no fue hasta 1990 que mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) lograron explicar la dualidad de colores que presentaba. Esta copa contiene nanopartículas de plata, oro y cobre, muestra un color rojo cuando la luz es absorbida por las nanopartículas de oro y un color verde cuando las nanopartículas de plata dispersan la luz [6].

En 1959, Richard Feynman expone al mundo su conferencia “Hay mucho espacio en el fondo” (*There is plenty of room at the bottom*) donde habla de las infinitas posibilidades al fabricar instrumentos a partir de átomos; es aquí donde inicia la Nanociencia como tal. En

1974 se habla ya de nanotecnología y se empiezan a desarrollar nuevos equipos, en especial microscopios electrónicos, utilizando principios cuánticos. También se crean nuevas estructuras como los fullerenos y los nanotubos de carbono. A partir del siglo XXI se introduce la nanotecnología en tratamientos médicos, aprovechando las propiedades físicas de los nanomateriales [7].

1.2. NANOTECNOLOGÍA

La nanotecnología estudia la síntesis y manipulación de estructuras en el rango de 1 a 100 nm (1×10^{-9} m). Involucra procesos relacionados con Química, Física, Biología e Ingeniería. Las nanopartículas pueden encontrarse en diferentes materiales, desde elementos como metales, hasta polímeros. Los nanomateriales se emplean en la medicina, la óptica, la electrónica, la industria alimenticia, cosmetológica, entre muchas otras [8].

La continua expansión de los diversos usos de las nanopartículas ha hecho necesario el uso de distintas técnicas para obtener nanoestructuras. Existen dos vías para alcanzar los nanomateriales: *top down* y *bottom up* (de abajo hacia arriba y de arriba hacia abajo en inglés), términos que describen el punto de partida para la obtención del producto final; en la Figura 1.1. se puede observar un esquema general de dichos procesos.

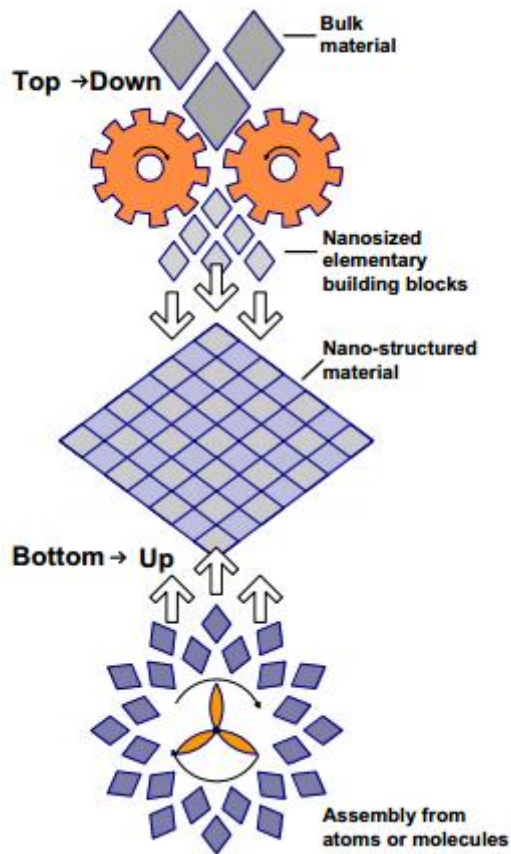


Figura 1.1. Esquema de los métodos *bottom up* y *top down* [9]

Las técnicas *top down* inician con uno o varios materiales en escalas micrométricas o mayores, que son sometidos a procesos, comúnmente fisicoquímicos, que disminuyen el tamaño del material hasta obtener estructuras nanométricas [9].

Los métodos más comunes de *top down* son la litografía y el grabado. Estos procesos se asemejan a un tallado, ya que, mediante un molde que se coloca sobre el material en bruto y el uso de radiaciones electromagnéticas se obtienen los objetos a nanoescala deseados [10].

Por otro lado, las prácticas *bottom up* consisten en partir de átomos o moléculas para ensamblar nanoestructuras, las cuales son de menor tamaño que aquellas obtenidas por métodos *top down*; las dimensiones varían frecuentemente entre 2 y 10 nm, el tamaño dependerá del control estricto de las condiciones involucradas en el proceso. Es mucho más fácil escalar procesos industrialmente mediante *bottom up* porque se utiliza menos energía lo que los hace más económicos [11].

Otra ventaja que presentan los procesos *bottom up* es que la funcionalización de las nanoestructuras es más accesible, ya que se pueden aprovechar las fuerzas interatómicas e intermoleculares para agregar características a la nanopartícula. Como resultado, las estructuras obtenidas por *bottom up* se utilizan en campos como la electrónica, la medicina y la biotecnología que requiere de partes nanométricas. [12]

1.3. NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Las nanopartículas metálicas pueden ser sintetizadas tanto por métodos *bottom up* como por *top down*; el método que se escoja será el que proporcione las características a las nanoestructuras.

Las nanopartículas metálicas, especialmente aquellas denominadas como “nobles”, de metales como las de oro y plata, se usan como agentes bactericidas debido a su gran

relación de área superficial/volumen [13], por lo que tienen diversas aplicaciones en muchos campos de la ciencia y la tecnología.

1.4. NANOPARTÍCULAS DE PLATA

La plata, por ser un metal precioso, se ha utilizado desde la antigüedad con fines sanitarios y médicos. Las sales metálicas se han utilizado para distintas aplicaciones como desinfección de agua, textiles y cosméticos [14].

El creciente interés por las nanopartículas de plata se debe a sus propiedades físicas, químicas y biológicas que se aprovechan en diversas aplicaciones como la catálisis, el almacenamiento de datos y el uso biomédico [15]. Las nanopartículas de plata pueden utilizarse de diferentes formas, ya sea soluciones coloidales o recubrimientos poliméricos sólidos, esta versatilidad también ha causado la expansión comercial de este tipo de nanopartículas, así como el desarrollo de nuevos métodos de obtención [16].

Las propiedades de las nanopartículas dependen de sus características. Las propiedades ópticas de las nanopartículas de plata están relacionadas con la estructura, la forma, la distribución de tamaño, entre otras, que pueden ser controladas mediante el método de síntesis [17].

Las nanopartículas de plata presentan propiedades ópticas especiales debido a la oscilación conjunta de los electrones libres por la interacción con la radiación electromagnética. Se produce un momento polar por el campo eléctrico de la radiación y se crea así una fuerza que intenta compensar el dipolo. El resultante de la interacción es una resonancia expresada como longitud de onda que proporciona el color característico a cada solución coloidal de nanopartículas de plata; este fenómeno se conoce como resonancia de los plasmones de superficie [15].

1.4.1. APLICACIONES

Las nanopartículas de plata tienen una alta capacidad antimicrobiana por la gran área superficial que presentan y otras propiedades como la forma y el tamaño [18]. El mecanismo de acción consiste en que las nanopartículas de plata se adhieren a la membrana celular, por lo que penetran a la bacteria, interactuando con las proteínas sulfuradas y con los compuestos fosforados como el ADN por la facilidad de formar puentes disulfuro. Una vez que las nanopartículas entran a la célula, la bacteria se aglomera para proteger el ADN de los átomos de plata, mientras que las nanopartículas afectan la cadena respiratoria causando la inhibición de la división celular, y por ende, la muerte de la bacteria [19]. Mientras menor sea el tamaño de partícula, tendrá una mayor área superficial, por lo que la interacción con la bacteria aumentará. La eficiencia de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas también depende de la forma, Pal *et al* [20] determinaron que se necesitaban

diferentes concentraciones de nanopartículas y en varias formas para que la inhibición bacteriana sea efectiva.

Las nanopartículas de plata también se destacan por inhibir la multiplicación de bacterias y virus. Lara *et al* [21] demuestran en su estudio que las nanopartículas de plata son capaces de inhibir la reproducción de los virus y de impedir su mutación, causando así una menor resistencia al agente antiviral. El mecanismo es similar al que se da en las bacterias, las nanopartículas de plata interactúan con proteínas de modo que la respiración celular se vea afectada.

El uso de nanopartículas como agentes antimicrobianos ha sido ensayado en diferentes microorganismos, y no cabe duda que estas nanoestructuras son un gran avance para el tratamiento de enfermedades y la prevención de las mismas [22]. Sin embargo, estas nanopartículas tienen muchos otros usos, como por ejemplo: la purificación de agua, el envasado y almacenamiento de alimentos, la industria agrícola, los productos cosméticos, los materiales de construcción y la electrónica.

Zhang [23], en su trabajo doctoral, describe cómo las nanopartículas de plata pueden utilizarse para la purificación del agua subterránea o superficial y hacerla apta para el consumo. Por otra parte, Patel *et al.* [24] en su investigación, han demostrado que las nanopartículas de plata son un excelente recubrimiento para la maximizar la acción

catalítica de las nanofibras porosas de sílica utilizadas en procesos de deshidrogenación. En el campo alimenticio, las nanopartículas de plata ayudan a preservar los alimentos, mejorar el tiempo de vida útil y su calidad. Sivakumar *et al.* [25] describen el uso de nanopartículas de plata para preservar la calidad de la leche.

1.4.2. TOXICIDAD

La exposición en seres humanos a las nanopartículas de plata, aumenta conforme se incrementan los estudios realizados para sus diversas aplicaciones. Si bien las nanopartículas de plata presentan un sinnúmero de beneficios en distintos campos de la ciencia, es necesario evaluar su impacto. Algunos estudios han encontrado que las nanopartículas de plata pueden causar daños en los pulmones, los riñones, el cerebro y especialmente el hígado, donde se acumulan [26].

Las nanopartículas pueden ingresar al cuerpo por distintas vías: oral, respiratoria o dérmica. La ingestión de nanopartículas puede ser perjudicial [27] debido a que el pH ácido del estómago provoca la liberación de iones plata (Ag^+) causando el ciclo tóxico de las nanopartículas dentro de las células en la actividad antimicrobiana. Por vía respiratoria, las nanopartículas se depositan en la cavidad nasal y en los alveolos pulmonares. También se encontró que, mediante inhalación, las nanopartículas de plata pueden llegar al torrente sanguíneo, probando que pueden distribuirse a través de todo el cuerpo [28]. Si bien se ha

investigado la exposición de nanopartículas de plata por vía dérmica, no ha presentado graves consecuencias más allá de coloraciones oscuras en la piel y leves irritaciones [27].

El exceso a la exposición de las nanopartículas de plata puede producir daños a la salud, sin embargo, no se ha llegado a un consenso para establecer un límite máximo permisible en productos que contengan estas nanoestructuras. Vela [29], en su estudio de toxicidad de nanopartículas, establece que existe mortalidad en un cierto tipo de células del epitelio bronquial de humanos (BEAS-2B) a partir de los 75 $\mu\text{L/mL}$ de suspensión coloidal. Además, concluye que, si bien se produce apoptosis celular, no existe daño genético. En otro estudio se determinó que la dosis letal 50 (DL_{50}) de las nanopartículas de plata por administración oral en cobayos dicha dosis es superior a los 5000 ppm y que no existe señal alguna de daño al exponer dérmicamente a los animales [30]. Por otro lado, Elkhawass [31] expone que la DL_{50} depende del tamaño de partícula y del método de evaluación toxicológica; en su investigación, encuentra que la toxicidad por vía peritoneal en ratones es de 213,8 mg/kg para nanopartículas de 20 nm, mientras que para nanopartículas de 50 nm la LD_{50} es de 391.5 mg/kg.

En cuanto a los daños en el ambiente, la toxicidad se genera cuando las nanopartículas son liberadas y se producen iones plata, como resultado un proceso de oxidación. En el agua, la contaminación se vuelve peligrosa cuando el ion plata se combina con aniones tales como sulfuro ($\text{S}^{=}$) o cloruro (Cl^{-}), generando un importante contaminante para especies acuosas.

Sin embargo, no se ha establecido un nivel de concentración tóxico de nanopartículas de plata en agua de desecho [32].

El Reglamento de productos biocidas de la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos (ECHA) no establece una normativa específica para el uso de nanopartículas en productos alimenticios, textiles o cultivos, sino que enuncia: "Se autorizará cualquier nanomaterial para uso como biocida únicamente si se ha evaluado el riesgo para la salud humana, los animales y el medio ambiente" [33]. Así, se evidencia que la regulación del uso de nanomateriales es un largo proceso debido a su diversidad y falta de protocolos establecidos [34].

1.4.3. MÉTODOS DE SÍNTESIS

Los métodos de síntesis de nanopartículas se dividen en físicos, químicos y biológicos. Dentro de los métodos físicos se encuentran la ablación láser y la evaporación-condensación. La ablación láser es uno de los métodos más comunes, pues se puede controlar el tamaño de partícula. La principal ventaja de este método es la generación de partículas libres de sustancias activas en la superficie, que se pueden generar en los métodos químicos en solución. Por otro lado, la evaporación-condensación genera partículas de menor tamaño y no se requiere de instrumentación costosa [16].

Dentro de los métodos químicos, el más conocido es la reducción a partir de una sal. La síntesis de nanopartículas de plata en disolución coloidal requiere de tres componentes: el precursor metálico, el agente reductor y el agente estabilizante. Los precursores más comunes son sales de plata como nitrato, acetato o complejos organometálicos de diamino-plata. [15].

El proceso de formación de nanopartículas se realiza en dos etapas: la nucleación y el crecimiento. En la etapa de nucleación se requiere una alta energía de activación para que se establezcan los núcleos del elemento, mientras que el proceso de crecimiento utiliza una energía de activación menor [35]. Las velocidades de cada etapa son las responsables del tamaño y la forma de la nanopartícula. El proceso, esquematizado en la Figura 1.2, se controla modificando las condiciones de reacción, como: la concentración del precursor, la temperatura, el pH, el agente reductor, la agitación, etc.

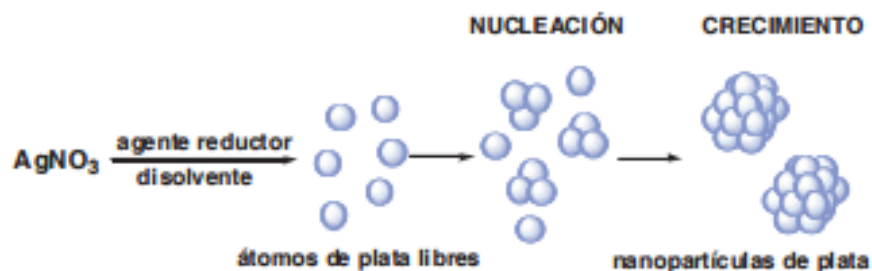


Figura 1.2. Proceso de formación de nanopartículas de plata a partir de una sal [35]

Si bien el método de reducción química es muy común y efectivo para la obtención de nanopartículas de plata, son necesarios reactivos tóxicos (como el borohidruro de sodio) como agentes reductores [36]. Es por esta razón que, durante los últimos años se han reemplazado los productos químicos por extractos naturales, de esta manera no solo se reduce la contaminación ambiental, sino que disminuye el costo de síntesis y además resulta conveniente la escala industrial [9]; en estos casos, el proceso pasa a denominarse "síntesis biológica".

Dentro de la síntesis biológica para la reducción del nitrato de plata se puede emplear material vegetal, levaduras, hongos o bacterias. Al usar extractos de plantas no se requieren ambientes altamente estériles, no existe riesgo biológico ni tampoco es necesario extraer o purificar las nanopartículas al final del proceso [36]. Con los extractos de plantas se proporciona además, un medio estabilizante no sólo por el contenido orgánico responsable de la reducción, sino por su composición química ya que contienen enzimas, proteínas, vitaminas, aminoácidos, etc. [37]. Los compuestos químicos pueden también funcionalizar las nanopartículas, es decir recubrir la superficie con distintos átomos, moléculas o iones para mejorar sus propiedades o cambiar sus funciones [9]. Estos compuestos potencializan las propiedades de las nanopartículas ya que, muchos de los extractos naturales se utilizan con fines medicinales, reforzando así la capacidad antimicrobiana de las nanopartículas [38]. Otro aspecto importante de la síntesis con extractos naturales es el uso de solventes; la mayor parte de agentes estabilizantes requieren de sustancias orgánicas para su disolución,

mientras que las sustancias reductoras presentes en las plantas pueden ser extraídas en medio acuoso, contribuyendo así con la química verde [35].

Ahmed *et al.* [9] mencionan que alrededor de cuarenta plantas de todo el mundo se han empleado como agentes reductores en la síntesis de nanopartículas de plata. Debido a la riqueza ecológica del Ecuador, se podría emplear un gran número de plantas nativas con este mismo propósito. En este estudio, la planta de marco (*Ambrosia arborescens*) ha sido seleccionada como precursor del extracto natural para utilizar como reactivo reductor dentro de la síntesis de nanopartículas. De acuerdo a la revisión bibliográfica, no se han realizado experimentos de síntesis con esta planta nativa, lo que implica que el presente trabajo es innovador y contribuye al desarrollo de la ciencia y tecnología del país.

1.5. PLANTA DE MARCO (*Ambrosia arborescens*)

La planta de marco (*Ambrosia arborescens*) es un arbusto que mide entre 0,5 y 3,0 m de alto. Tiene el tallo en forma de cilindro erguido, ramoso y de color verde blanquecino. Las hojas son alternadas, divididas en pequeños segmentos como se puede evidenciar en la Figura 1.3. Los frutos son ovalados, de color pardo y se dan una vez al año [39].



Figura 1.3. Hoja de la planta de marco [35]

La planta de marco es nativa de toda la región de la Cordillera de Los Andes, especialmente en Colombia, Perú y Ecuador. Crece a una altura de 2500 a 3000 metros sobre el nivel del mar. En el Ecuador, se encuentra en el centro y norte de la región interandina. Las hojas y las ramas se utilizan como insecticidas. También se utiliza en infusiones para tratar varias enfermedades como las hemorroides, reumatismo y disentería. Las hojas maceradas se colocan en la piel y en alimentos como antimicóticos [40].

Dentro de los principios activos que posee el extracto de planta de marco, se destacan lactonas, terpenos y polifenoles [41]. Estos compuestos, junto a los azúcares y otros elementos presentes en los extractos, son los responsables de producir la reducción en la síntesis de nanopartículas de plata. Tanto Ibarra [44] como Vera [43] reportan en sus estudios la presencia de dos polifenoles importantes en la planta de marco: 3',4',5,7-tetrahidroxi-3,6,8-trimetoxi flavona ($C_{18}H_{16}O_9$) y limocitrin ($C_{17}H_{14}O_8$); las estructuras de

ambos se muestran en la Figura 1.4; estos se encuentran en una abundancia del 4.5% y 8.5% respectivamente en relación al contenido de polifenoles totales.

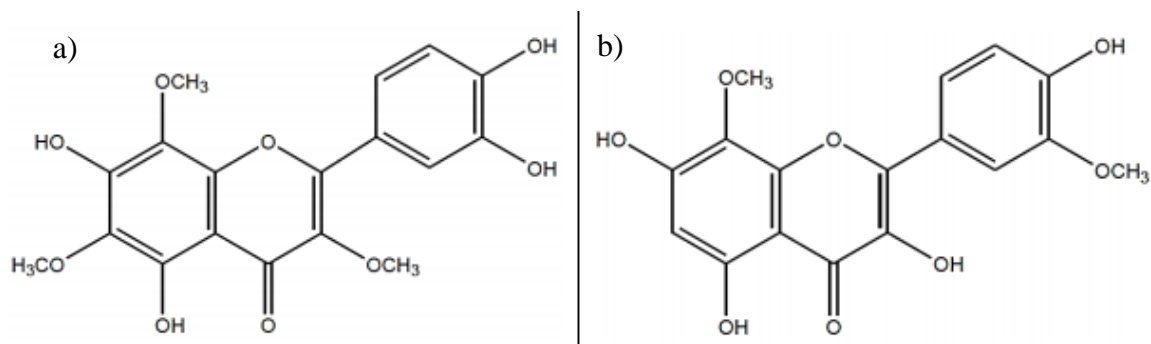


Figura 1.4. 3',4',5,7-tetrahidroxi-3,6,8-trimetoxi flavona (a) y limocitrin (b)

Además, se ha demostrado que estos compuestos de los extractos de la planta de marco (*Ambrosia arborescens*), tienen propiedades bactericidas y actividad antiproliferante [44].

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. PREPARACIÓN DE EXTRACTO

El material vegetal de *Ambrosia arborescens* (marco) se recogió del sector de Calacalí, al noroccidente de la provincia de Pichincha. Las hojas se limpiaron y se secaron a la sombra por siete días a temperatura ambiente. Posteriormente, se secaron en estufa a 40°C por 48 horas; la muestra seca fue triturada en un mortero. Para la preparación del extracto se pesó 1 g de material vegetal y se agregaron 20 mL de agua destilada para obtener una concentración de 0,05 g/mL. La mezcla se colocó en agitación constante durante una hora a 60°C \pm 1°C, transcurrido el tiempo se filtró el extracto y se almacenó a 4°C hasta su uso.

2.2. OPTIMIZACIÓN DE LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Las condiciones a optimizar en el proceso de síntesis fueron: concentración de nitrato de plata, temperatura, tiempo, cantidad de extracto y pH. Para cada uno de estos parámetros se consideraron cinco valores tomando como referencia la síntesis realizada por Ahmed e Ikram [45]. Cada síntesis fue realizada por separado, variando un solo parámetro y

manteniendo constantes las condiciones restantes. A continuación, se muestra la Tabla 2.1 con los valores de prueba de cada parámetro.

Tabla 2.1. Condiciones de prueba para la optimización de síntesis

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Cantidad de extracto (mL)	pH	Concentración de nitrato de plata (mM)
40	10	1,0	7	0,1
45	20	1,5	8	0,5
50	30	2,0	9	1,0
55	40	2,5	10	5,0
60	50	3,0	11	10,0

2.3. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Se preparó una solución de nitrato de plata 1 mM utilizando un reactivo marca Scharlau® de 99.9% de pureza. Se tomaron 20 mL de la solución nitrato de plata y se agregaron gota a gota 2 mL de extracto de marco. Se añadieron de 2 a 3 gotas de NaOH 1% para regular el pH a 8. Esta mezcla se agitó durante 50 minutos a una temperatura de $50^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. La solución coloidal se dejó enfriar y se almacenó en recipientes ámbar a 4°C para análisis posteriores.

2.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Para la caracterización de las nanopartículas de plata se aprovecharon las propiedades ópticas que permiten el análisis por espectroscopia, como son la Espectrofotometría UV-Vis y la Espectroscopia de Infrarrojos con Transformadas de Fourier (FTIR). Por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) se determinó el tamaño y se realizó el análisis elemental (SEM-EDX).

2.4.1. ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS

El plasmón de resonancia de la superficie de las nanopartículas de plata hace posible el análisis por espectroscopia UV-Vis ya que absorbe a una longitud de onda aproximada a los 430 nm correspondientes a un tamaño de partícula entre 20 y 50 nm [46].

La espectroscopia UV-Vis se basa en el proceso de absorción de una molécula de la radiación electromagnética en el rango ultravioleta-visible (aproximadamente entre 200 y 700 nm). La absorción de radiación electromagnética en este rango provoca la excitación electrónica, es decir el paso del electrón a un nivel superior de energía [47].

Si un haz de radiación monocromática de una intensidad dada pasa a través de una celda que contiene una especie absorbente de cierta concentración, se producirá una disminución en la intensidad del haz debido a la interacción de los fotones con la especie absorbente. A esta reducción se la denomina transmitancia (T) y se expresa de la siguiente manera.

$$\%T = \frac{I}{I_0} \times 100 \quad (2.1)$$

Donde: I= intensidad del haz emergente

I_0 = intensidad del haz incidente

La absorbancia es el logaritmo negativo en base 10 de la transmitancia [48].

$$A = -\log_{10} T \quad (2.2)$$

El análisis cuantitativo se da debido a que la cantidad de radiación absorbida es proporcional a la cantidad de sustancia presente en la muestra. Esta relación está dada por la Ley de Lambert-Beer donde se menciona que la cantidad de luz absorbida es proporcional al número de moléculas absorbentes.

$$A = \varepsilon \times b \times c \quad (2.3)$$

Donde: A= absorbancia

ε = absortividad molar

b= longitud del camino óptico

c= concentración molar

La absorptividad molar o coeficiente de extinción es característico de cada molécula a condiciones determinadas de solvente, longitud de onda, temperatura y de las condiciones del instrumento [49].

La medida de la absorbancia se realiza con un instrumento denominado espectrofotómetro, esquematizado en la Figura 2.1. Los componentes principales de estos equipos son: una fuente de radiación electromagnética, un monocromador, un recipiente para la muestra o celda y finalmente un detector [50].

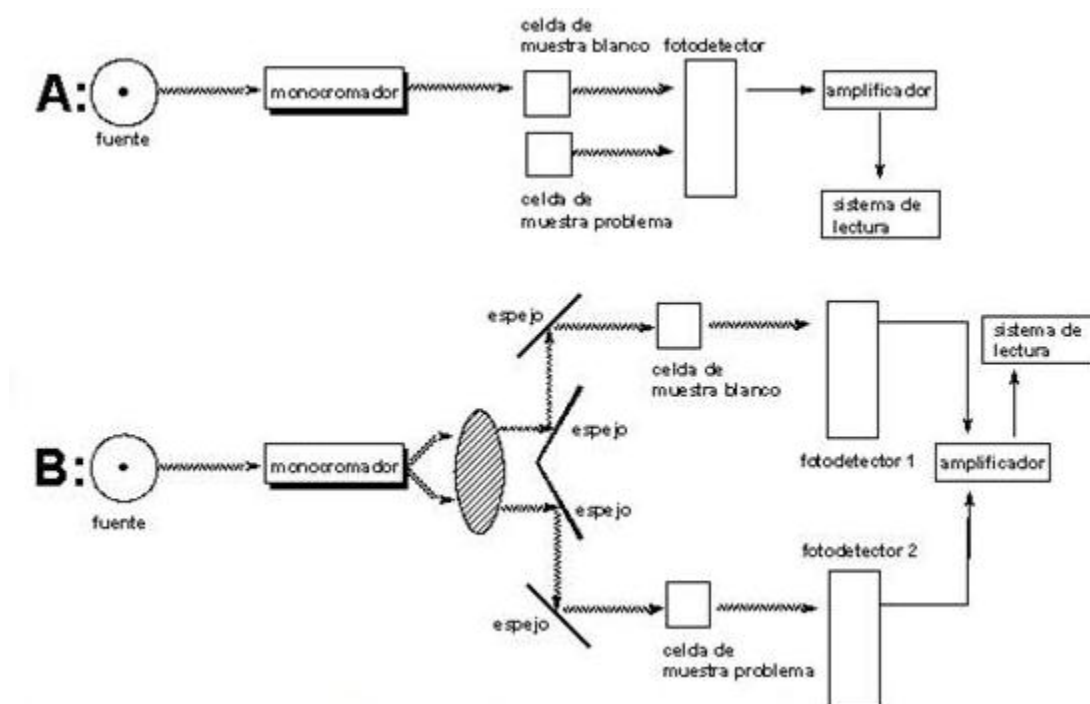


Figura 2.1. Espectrofotómetro UV-Vis: diagrama de un instrumento de simple haz (a) y diagrama de un instrumento de doble haz (b) [51]

La fuente de radiación debe producir un haz homogéneo y generar la menor cantidad de ruido, es por esto que las fuentes más comunes son la lámpara de descarga de hidrógeno, la lámpara de arco de deuterio y la lámpara de filamento de tungsteno o wolframio. Esta última es la más utilizada, ya que produce longitudes de onda comprendidas entre los 320 y los 2500 nm [52].

El segundo componente es el monocromador. Este dispositivo provoca que la luz se disperse con diferentes ángulos y luego pase a una rendija donde se selecciona la longitud de onda. Pueden utilizarse prismas o redes de difracción. Las redes son más precisas y de menor costo [48].

Los detectores tienen como función convertir la señal radiante en señal eléctrica. Estos deben ser estables, ofrecen una respuesta lineal con bajo ruido y alta sensibilidad. Los equipos modernos cuentan con un fotodiodo, sin embargo, también existen equipos que cuentan con un fototubo multiplicador. [53].

2.4.1.1. INSTRUMENTACIÓN

Las nanopartículas se analizaron en un espectrofotómetro de doble haz Cary 60 de Agilent Technologies. La resolución del equipo fue de 1 nm y el intervalo de medida fue de 350 a

800 nm. La línea base se corrigió empleando como blanco agua destilada. Los datos se analizaron utilizando el software Cary WinUV 3.1, aplicación Scan.

2.4.1.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Se realizaron diluciones 1 a 10 con agua destilada de las soluciones coloidales obtenidas del proceso de síntesis y se colocaron en celdas de poliestireno (Agilent Technologies) de 1 cm de camino óptico

2.4.2. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJOS

La Espectroscopía de Infrarrojos (IR) funciona bajo el mismo principio de absorción de la espectroscopía UV-Vis. Esta técnica se fundamenta en que la radiación de la región infrarroja (0,78 a 1000 μm) tiene la suficiente energía como para causar vibraciones en las moléculas. Estas vibraciones pueden ser de tensión o de flexión. Las vibraciones de tensión se caracterizan por el cambio de la distancia entre los átomos, mientras que las vibraciones de flexión vienen dadas por el cambio en el ángulo entre dos átomos [54]. Los movimientos de una molécula simple se observan en la Figura 2.3. Todas las moléculas asimétricas que posean un momento dipolar presentarán un cambio en el momento dipolar al momento de la vibración. Es por esto que las moléculas homonucleares como los elementos diatómicos no absorben en el infrarrojo [55].

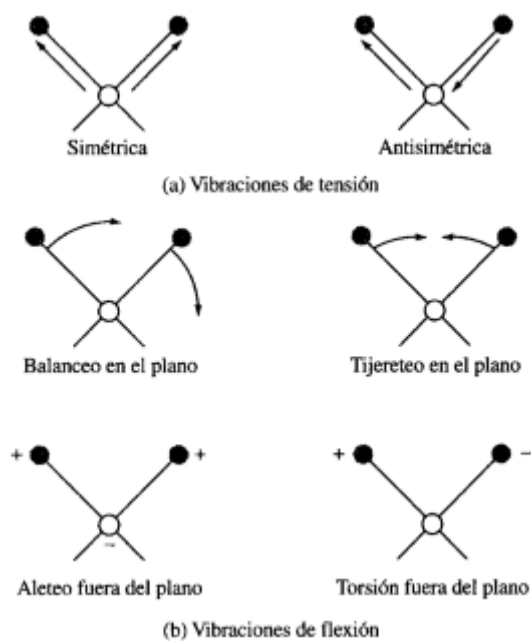


Figura 2.2. Tipos de vibraciones en una molécula simple causadas por la radiación IR [56]

Los espectros IR se caracterizan por tener en el eje X al número de onda (el inverso de la longitud de onda), ya que existe una directa proporcionalidad entre el número de onda y la frecuencia de vibración de cada molécula o grupo de átomos [57].

El análisis por espectroscopía IR tiene mayor aplicación en el ámbito cualitativo debido a que cada grupo funcional produce una banda o pico ancho en determinado número de onda, por lo que, se pueden identificar ciertas moléculas o grupos de moléculas presentes en una muestra [58].

Los equipos para el análisis IR son similares en cuanto a los componentes a un equipo UV-Vis. Constan de una fuente de radiación, el portamuestras y el detector. Actualmente los equipos de análisis infrarrojo se denominan FTIR (Infrarrojo con Transformadas de Fourier, por sus siglas en inglés). A diferencia de los equipos dispersivos que contienen una red de difracción o un dispersor de haz, los equipos FTIR funcionan con un interferómetro de Michelson y una operación matemática realizada en el procesador para obtener una señal más precisa, con mejor resolución y en un tiempo menor [60].

Las fuentes de radiación en el rango infrarrojo contienen un alambre que se calienta por diferencia de potencial o corriente eléctrica a altas temperaturas y emiten radiación infrarroja. Existen diferentes fuentes como el Emisor de Nerst, la Fuente Global o el filamento incandescente, la diferencia radica en el material sólido que se calienta [59].

La modalidad más utilizada para colocar las muestras son los acoples de Reflectancia Total Atenuada (ATR por sus siglas en inglés). Consisten de un cristal con alto índice de refracción, por el cual se hace incidir la radiación infrarroja con un ángulo superior al crítico. De esta manera, se forma una onda evanescente que produce la atenuación de la radiación. La disminución de la radiación es medida por el detector [61].

El detector más común utilizado para los equipos con Transformada de Fourier son los piroeléctricos de sulfato de triglicina. Se encargan de transformar la señal óptica en una

señal eléctrica y obtener de esa manera el interferograma de la intensidad resultante de la interferencia de los haces [60]. Para obtener el espectro de la transmitancia en función de la longitud de onda, el procesador de señal o el software del equipo se encarga de realizar un algoritmo matemático llamado la transformada de Fourier, de aquí el nombre del equipo. También se debe realizar un barrido sin muestra llamado barrido de fondo o *background*, que se realiza sin la división del haz para corregir sustancias del ambiente como agua o dióxido de carbono [61]. El esquema general con los componentes de un equipo FTIR se muestra en la Figura 2.4.

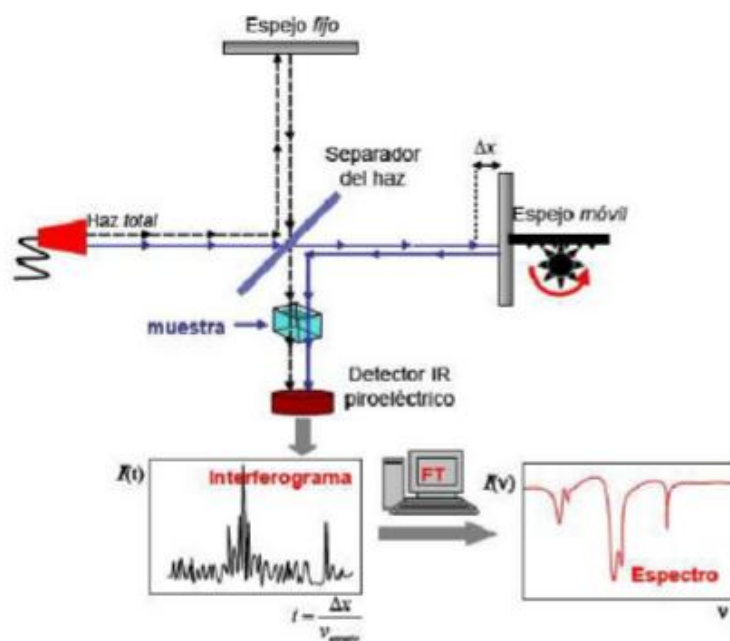


Figura 2.3. Diagrama de un equipo FTIR [61]

En la caracterización de las nanopartículas de plata, los espectros IR tienen como objetivo determinar los grupos funcionales que se encuentran recubriendo la nanopartícula. Al

trabajar con extractos naturales, se pueden observar los grupos funcionales que participan en la síntesis [62].

2.4.2.1. INSTRUMENTACIÓN

Los análisis de Espectroscopia de Infrarrojos se realizaron en un equipo Spectrum BX Perkin Elmer con acople ATR Miracle Pike bajo las condiciones de resolución de 4 cm^{-1} , rango entre 4000 cm^{-1} y 500 cm^{-1} y diez barridos por muestra. Antes de cada lectura se realizó un espectro de fondo (*background*) para la corrección de los espectros de las muestras. El software utilizado para el análisis de datos fue Spectrum, versión 5.0.1 de Perkin Elmer.

2.4.2.2. ANÁLISIS DE MUESTRAS

Tanto el extracto como las nanopartículas sintetizadas, se secaron en una estufa P Selecta 200 a 60°C durante 24 horas y se colocaron directamente en el portamuestras del equipo utilizando un acople de ATR.

2.4.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

La microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) es una técnica de análisis de superficies que utiliza un haz de electrones de gran energía que interactúa con una muestra opaca a los electrones. Esta técnica permite obtener resultados de la topología, la composición química y la estructura cristalina de muestras, es por esto que se usa para estudiar micro y nanoestructuras [63].

Los microscopios electrónicos de barrido están constituidos por tres componentes principales, el cañón de electrones, las lentes electromagnéticas y la pantalla o detector. Como se puede observar en la Figura 2.6, el cañón de electrones es el responsable de generar el haz de electrones [64], que se puede producir por efecto termoiónico o por emisión de campo. En la emisión termoiónica un filamento de tungsteno o hexaboruro de lantano se somete a altas temperaturas por una diferencia de potencial que forma un haz de electrones, mientras que en la emisión de campo se utiliza un campo eléctrico y vacío para desprender electrones [65].

El segundo componente son las lentes electromagnéticas. Consisten en un aro de acero envuelto con un alambre de cobre por el que pasa la corriente para crear el campo electromagnético. Las funciones de estas lentes son colimar el haz de electrones haciéndolo casi puntual, enfocar el área de la muestra y amplificar la imagen [66].

El último elemento es el dispositivo de lectura que está formado por algunos detectores que registran de los fenómenos electrónicos que se den en la muestra. Los fenómenos que se pueden dar son: la muestra emite electrones secundarios como consecuencia del impacto del haz de electrones, los electrones se reflejan en la muestra, los electrones son absorbidos por la muestra, la muestra emite rayos X y la muestra emite fotones. Para cada fenómeno existe un detector, que el equipo cuente con uno u otro depende del uso que se le de al instrumento [67].

Es importante mencionar que el SEM requiere de un sistema de vacío para que el haz emitido tenga una mejor resolución y también para que las partículas del ambiente no interfieran en el camino del haz ni produzcan electrones que puedan interferir en el análisis [68].

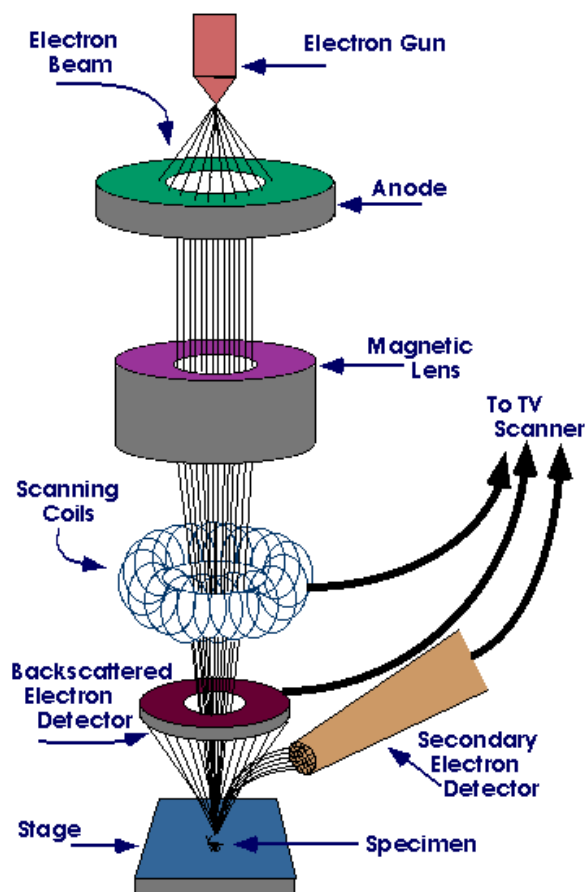


Figura 2.4. Diagrama básico de un equipo SEM [69]

2.4.3.1. INSTRUMENTACIÓN

El análisis SEM se llevó a cabo en un equipo Phenom Pro X, utilizando un voltaje de 10 kV. El software utilizado para el análisis de datos fue Prosuite-EDS de la empresa NanoInstrumentos.

2.4.3.2. ANÁLISIS DE MUESTRAS

Las nanopartículas en solución coloidal fueron secadas en la estufa P Selecta 200 a 60°C por 24 horas y luego se colocaron directamente en el pin con un recubrimiento de carbono.

2.5. ESPECTROFOTOMETRÍA ABSORCIÓN ATÓMICA DE LLAMA PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PLATA

El método de Absorción Atómica de Llama es útil para determinar la cantidad de plata contenida en las nanopartículas y por lo tanto determinar qué cantidad de plata de la sal inicial se convierte en nanoestructuras [70].

La espectrofotometría de absorción atómica de llama es una técnica utilizada para medir la absorción de radiación de los átomos libres. Un átomo es capaz de absorber energía cuando se encuentra en estado fundamental y experimenta una transición, alcanzando un estado de mayor energía. Al ser este estado inestable, el átomo vuelve a su estado basal y emite una radiación de una determinada longitud de onda, característica de cada elemento [71]. La cantidad de radiación absorbida es proporcional a la cantidad de átomos en estado basal, de aquí el principio de la cuantificación por este método; cumpliendo también con la Ley de Lambert-Beer. El camino óptico de la radiación será siempre el mismo y la absortividad

molar es propia de cada elemento, dando como resultado que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración [72].

Los componentes esenciales de un espectrofotómetro de absorción atómica son la fuente, el atomizador, el mechero (portamuestras), el monocromador y el detector, como se puede observar en la Figura 2.8.

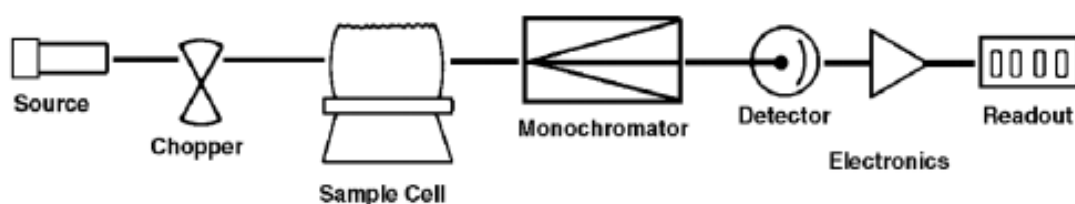


Figura 2.5. Diagrama de un espectrofotómetro de absorción atómica [73]

Las dos fuentes de radiación más comunes son la lámpara de cátodo hueco y la lámpara de descarga. La lámpara de cátodo hueco está constituida por un ánodo de tungsteno y un cátodo del metal cuyo contenido se quiere cuantificar. Cuando se aplica una corriente, el gas se ioniza causando el desprendimiento de iones del cátodo. Estos iones, al volver a su estado fundamental, emiten radiación característica de cada elemento [48]. La lámpara de descarga funciona sin electrodos, solo contiene una porción de metal o de sal del elemento que se quiere analizar y que está dentro de un cilindro de cuarzo con un gas inerte. La ionización del gas y la emisión de radiación se producen mediante una radiofrecuencia. Luego de la lámpara se encuentra un modulador rotatorio que sirve para amplificar la radiación de la lámpara y a su vez despreciar la radiación emitida por la llama [74].

La atomización es un proceso clave para la absorción atómica. En esta etapa, se producen átomos libres en estado fundamental. El primer componente para el proceso es el nebulizador que se encarga de convertir la solución que se introduce por el capilar en gotas diminutas que forman un aerosol. Luego, en la cámara de mezcla, el aerosol procedente de la muestra se mezcla con el flujo de gas oxidante y se combina con el gas combustible. Esta mezcla llega finalmente a la ranura del mechero donde se quema [75].

La llama debe tener características especiales dependiendo del elemento a analizar. Debido a las altas temperaturas que se deben alcanzar para que se produzca la atomización, se utiliza acetileno como combustible y aire comprimido u óxido nitroso como comburente o gas de soporte. Se debe tener en cuenta también la proporción de combustible/comburente para que se genere una llama con una región interconal amplia ya que es donde se produce la mayor cantidad de átomos libres [76].

Luego del mechero se encuentra el monocromador, cuya finalidad es seleccionar la longitud de onda característica del elemento que debe llegar al detector. Al igual que en el espectrofotómetro UV-Vis, se pueden usar prismas, rejillas de difracción o una combinación de los dos [77].

Finalmente, el detector suele ser un fototubo multiplicador que amplifica y convierte la señal radiante en señal eléctrica proporcional a la intensidad de la radiación [75].

2.5.1. INSTRUMENTACIÓN

El contenido de plata se analizó en un espectrofotómetro de Absorción Atómica Perkin Elmer AAnalyst 400, utilizando una lámpara Perkin Elmer de cátodo hueco de plata a una longitud de onda de 328.1 nm con una corriente de 12 mA. Se empleó un flujo de 10,0 L/min de aire (obtenido de compresor) y 2,5 L/min de acetileno (AGA, 4.9) para la llama y un slit de 2,7 nm. Los datos se analizaron con el software WinLab32, versión 7.0 de Perkin Elmer.

2.5.2. ANÁLISIS DE MUESTRAS

Para la lectura de las muestras, una vez verificado el desempeño del método, se realizó una dilución 1:100 con agua destilada de las soluciones coloidales obtenidas y se leyó directamente con la curva de calibración (apartado 2.5.3.1.) bajo las condiciones establecidas. Además, se leyó el extracto de hoja de marco como blanco reactivo.

2.5.3. EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DEL MÉTODO

Con el fin de obtener resultados confiables y comprobar el buen desempeño del equipo, se realizó la evaluación del desempeño del método para determinar plata. Se determinó el rango lineal mediante una regresión lineal, el porcentaje de recuperación y finalmente se fijó el límite de cuantificación y de detección.

2.5.3.1. LINEALIDAD

La linealidad es el parámetro que refleja la relación de proporcionalidad entre la concentración del analito y la señal de respuesta. Se determina mediante el tratamiento matemático de los resultados obtenidos a diferentes concentraciones de un estándar. Lo más común es realizar un gráfico denominado curva de calibración donde se representen en el eje X los valores de las concentraciones y en el eje Y los valores de la señal de cada concentración [78]. Luego de obtener el gráfico, se pueden analizar valores como el coeficiente de correlación (R^2) que determina la semejanza de la curva a una línea recta, este debe ser mayor a 0,990 [79]. También se puede analizar los valores de pendiente e intercepto para obtener resultados acerca de la sensibilidad del método y la presencia de errores [80]. La ecuación de la recta viene dada por:

$$y = mx + b \quad (2.4)$$

Donde: y= es la señal de respuesta

m= pendiente de la recta

x= concentración

b= intercepto

Para calcular el coeficiente de correlación se usa la ecuación siguiente:

$$r^2 = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{[\sum_i (x_i - \bar{x})^2][\sum_i (y_i - \bar{y})^2]}} \quad (2.5)$$

Para la curva de calibración se realizaron diluciones acuosas del estándar de plata de marca Inorganic Ventures® de concentración 996±3 ppm. La concentración de los estándares fue de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 y 5,0 ppm respectivamente y se realizó una relación lineal con intercepto calculado.

2.5.3.2. PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN

La recuperación mide la respuesta del equipo respecto a una adición de estándar o analito conocido en una matriz sin interferencias. Para este ensayo se debe realizar por triplicado una misma concentración conocida, se puede realizar también a todos los niveles de la curva de calibración [81]. Para métodos de bajas concentraciones se recomienda una recuperación entre 90 y 110% [82].

Las fortificaciones se realizaron en dos puntos de la curva en una matriz acuosa, en 1 ppm y en 4 ppm, por triplicado, se obtuvo la media y la desviación estándar de cada punto.

2.5.3.3. LÍMITE DE DETECCIÓN Y DE CUANTIFICACIÓN

El límite de detección (LOD) se define como la menor cantidad de analito que puede detectar un equipo sin cuantificarlo necesariamente. El límite de detección es la mínima concentración que puede ser diferenciada del ruido del equipo [83].

Por otro lado, el límite de cuantificación (LOQ) es la mínima cantidad de analito que puede ser cuantificada con un nivel confiable de precisión y exactitud. Ambos límites se calculan mediante la lectura de mínimo seis blancos que pueden o no contener matriz [84].

Los límites pueden calcularse mediante las ecuaciones 2.8 y 2.9.

$$LOD = 3S_b \quad (2.8)$$

$$LOQ = 10S_b \quad (2.9)$$

El límite de detección y de cuantificación se calculó a partir de la lectura en el equipo de 10 blancos únicamente de agua destilada.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO

El disolvente elegido para la preparación del extracto fue agua con fin de contribuir a la química verde, razón por la cual no se realizó pruebas con otros solventes. Adicionalmente, se realizó un análisis por Espectroscopía UV-Vis donde no se observó ningún pico que podría haber interferido en el análisis de las nanopartículas. El extracto obtenido tenía una coloración café verdosa que mantenía sus propiedades por 45 días al conservarlo a 4°C.

3.2. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA

El indicio de formación de nanopartículas se da en el cambio de coloración de la solución. El extracto de color café verdoso (Figura 3.1a) se vuelve marrón (Figura 3.1b) el momento en el que se forman las nanopartículas debido a que este es el color característico de las nanopartículas de plata entre 2 y 100 nm causado por la resonancia de los plasmones de superficie, resultado similar a la de la mayor parte de estudios. El color marrón de las nanopartículas se mantiene por aproximadamente 30 días cuando están en refrigeración.

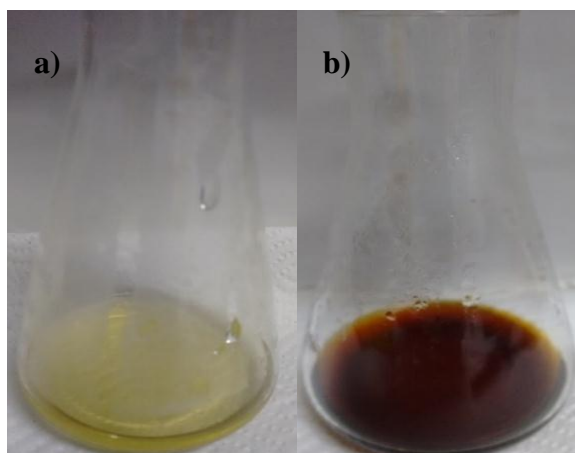


Figura 3.1. Extracto de marco con nitrato de plata antes (a) y después (b) de la formación de nanopartículas

3.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA

3.3.1. ESPECTROSCOPÍA UV-VIS

Dentro de la optimización del método se analizaron los espectros UV-Vis para monitorizar la formación de nanopartículas. Rodríguez *et al.* señala que el pico característico del plasmón de resonancia de las nanopartículas de plata se presenta alrededor de los 425 nm cuando el tamaño de partícula varía entre los 2 y los 40 nm [85]. Es por esta razón que las condiciones óptimas de síntesis se escogieron en función de los espectros UV-Vis realizados para cada síntesis. Los parámetros que se optimizaron fueron la concentración de la solución de nitrato de plata, la temperatura, el tiempo, el pH y el volumen de extracto, factores que influyen en las características de las nanopartículas

3.3.1.1. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRATO DE PLATA

El primer factor que se optimizó dentro de la síntesis de nanopartículas fue la concentración de nitrato de plata. En los espectros UV-Vis obtenidos (Figura 3.2) se puede observar que a mayor concentración de AgNO_3 existe una mayor cantidad de nanopartículas formadas.

Se seleccionó el valor de concentración de nitrato de plata 1.0 mM como concentración óptima, ya que se produce el pico de absorción máxima a 409 nm, mientras que a concentraciones mayores (5,0 y 10,0 mM) se produce un desplazamiento del pico de máxima absorción hacia 433 nm indicando nanopartículas de mayor tamaño. En cuanto a la estabilidad, las nanopartículas sintetizadas con concentraciones de 5.0 y 10.0 mM fueron menos estables, al pasar 48 horas se tornaban color gris debido a la oxidación. Con concentración de 1.0 mM presentaban el pico de absorción hasta treinta días después de su síntesis. A concentraciones menores (0,1 y 0,5 mM) el pico de absorción máxima se vuelve menos pronunciado y se ensancha, lo que resulta en partículas con mayor dispersión en cuanto al tamaño. Mansouri y Ghader [86] prueban en su estudio que a concentraciones menores de 0,5 mM se obtienen nanopartículas de plata triangulares y no esféricas. Adicionalmente, Vanaja *et al.* [87] sugieren que las condiciones óptimas de trabajo con cualquier extracto siempre serán utilizando AgNO_3 a una concentración de 1.0 mM para obtener nanopartículas del menor tamaño con un mayor rendimiento.

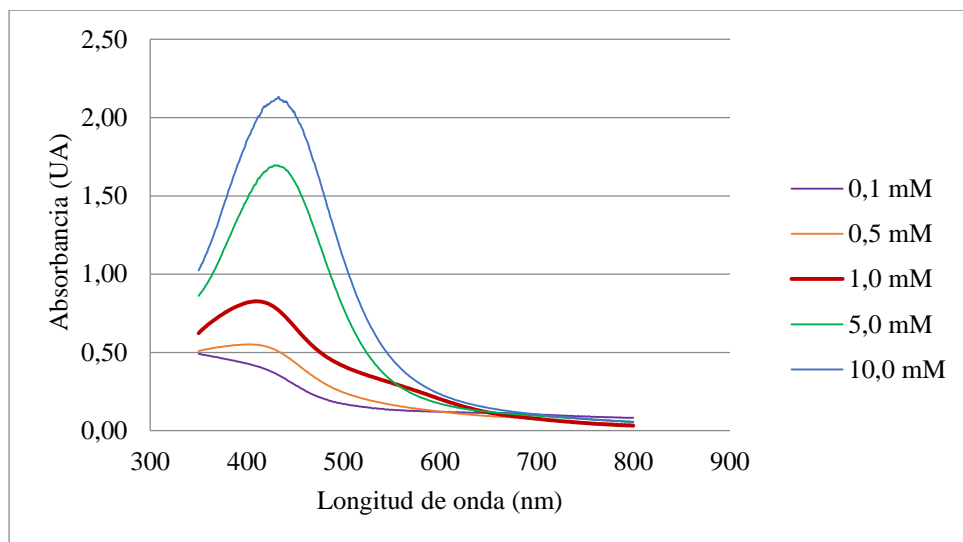


Figura 3.2. Espectros Visibles de nanopartículas de plata sintetizadas a varias concentraciones de AgNO_3

3.3.1.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA

Como se puede evidenciar en los espectros UV-Vis (Figura 3.3), el pico de máxima absorbancia se obtiene a los 60°C ; sin embargo, no difiere significativamente de la absorbancia de la síntesis a 50°C . Debido a que el enfoque de la síntesis con extractos naturales se centra en la optimización de recursos, se escogió la temperatura de 50°C como óptima ya que requiere menos energía. Se descartó la temperatura de 55°C debido a la presencia de un pico ancho a los 600 nm, lo cual puede ser indicio de agregación de las nanopartículas, volviendo así más inestable a la solución coloidal [88]. A temperaturas menores, el pico de absorción máxima se desplaza hacia longitudes de onda mayores y se obtiene nanopartículas de mayor tamaño. Resultados similares presentan Verma y Singh [89]. Por otro lado, una menor temperatura permite el control de la dispersión en el tamaño

de las nanopartículas; El-Kemary *et al.* [90] realizaron un estudio con extracto de *Ambrosia maritima* y encontraron que la temperatura óptima de síntesis fue de 60°C, obteniendo nanopartículas de entre 30 y 50 nm. Al realizar un seguimiento mediante Espectroscopía de Infrarrojos, encontraron que, al variar la temperatura entre un rango de 40 a 60°C, las nanopartículas presentan espectros semejantes, probando que no existía degradación de compuestos en el extracto.

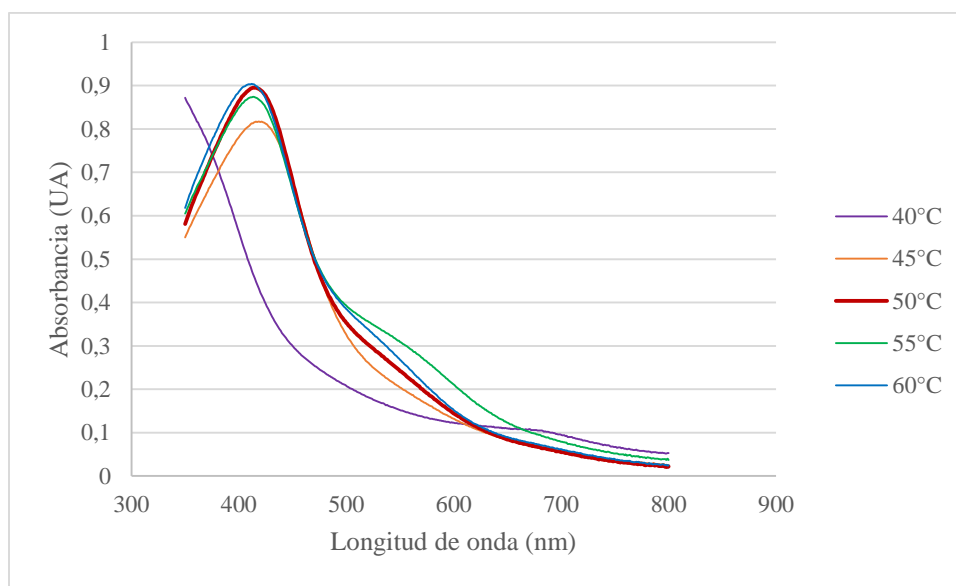


Figura 3.3. Espectros Visibles de nanopartículas de plata sintetizadas a varias temperaturas

3.3.1.3. EFECTO DEL TIEMPO

De acuerdo a los espectros UV-Vis que se observan en la Figura 3.4, se encontró que, a mayor tiempo de reacción entre el nitrato de plata y el extracto de marco, se forman mayor

cantidad de nanopartículas. Sin embargo, cuando se superan los 50 minutos, las nanopartículas se aglomeran y el pico de máxima absorción se desplaza hacia longitudes de onda mayores [91]. La forma del pico cambia con tiempos menores dado que la reducción no es completa. Los resultados se asemejan a los obtenidos por Velmurugan *et al.* [92], quienes trabajaron con una planta rica en flavonoides y de la familia Asteraceae, al igual que la planta de marco.

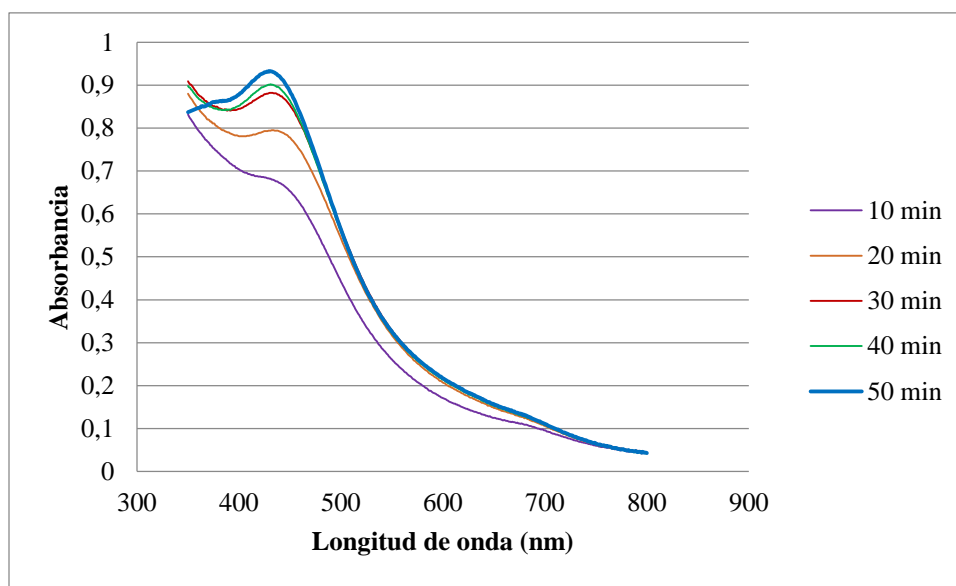


Figura 3.4. Espectros Visibles de las nanopartículas de plata sintetizadas a varios tiempos

3.3.1.4. EFECTO DEL pH

En los espectros UV-Vis de la Figura 3.5, se observó que la mayor absorbancia se da en un valor de 8. Esto se debe a que las nanopartículas se forman con mayor facilidad en medios

básicos donde predominan los grupos hidroxilo [93]. Es posible obtener nanopartículas de plata en rangos de pH entre 4 y 7 aunque la cantidad formada es mínima, obteniendo picos de baja intensidad [94]. Esto ocurre al realizar la síntesis de las nanopartículas sin agregar hidróxido de sodio, si bien la reacción es positiva, se obtiene una baja absorbancia. A valores de pH mayores a 10, el pico de máxima absorción se ensancha, indicando que las nanopartículas se aglomeran, reduciendo la estabilidad de la suspensión coloidal. Alquadi *et al.* [95] mencionan que el tamaño de partícula es inversamente proporcional al pH de la mezcla de reacción; sin embargo, destacan que conforme el pH aumenta, la dispersión del tamaño incrementa también.

El pH también influye en la forma de las nanopartículas, a pH ligeramente básico, las nanopartículas sintetizadas son esféricas, ampliando el campo de aplicación de las mismas [96].

Una de las razones por las cuales la síntesis no se desarrolla a pH mayor a 8 es la ionización de los compuestos fenólicos del extracto de marco, resultados similares presentaron Heydari y Rashidipour [97] y Sumi Maria *et al.* [98].

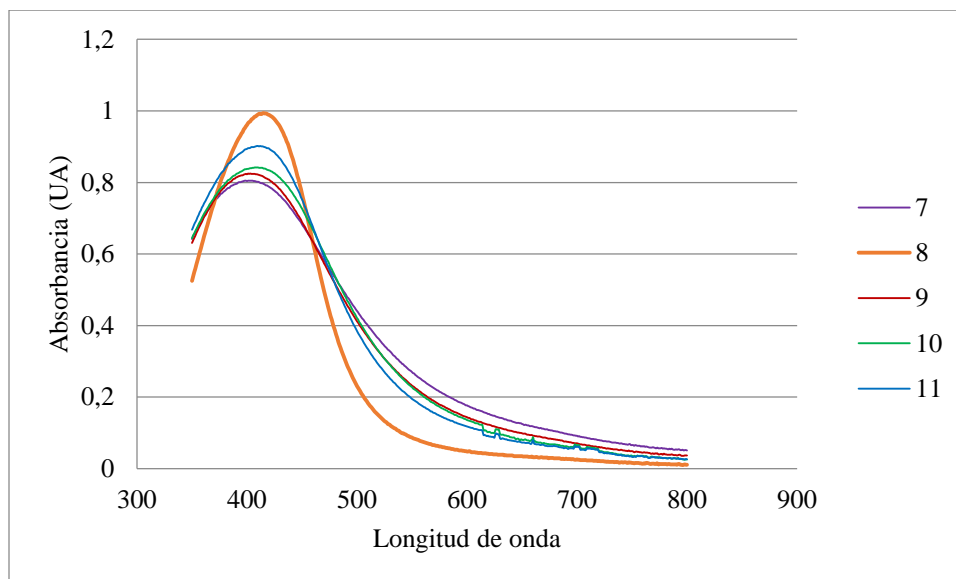


Figura 3.5. Espectros Visibles de nanopartículas de plata sintetizadas a varios pH

3.3.1.5. EFECTO DE LA CANTIDAD DE EXTRACTO

La cantidad de extracto es otro factor importante que afecta la síntesis de las nanopartículas. En este caso se debe encontrar la cantidad de extracto de marco que provoque la completa reducción de los iones de plata de la sal precursora. Como se puede observar en la Figura 3.6 donde se encuentran los espectros UV-Vis, la concentración óptima es de 2.0 mL. En un estudio realizado por Ibrahim [99], se menciona que mientras mayor sea la cantidad de extracto, habrá mayor disponibilidad de moléculas reductoras, por lo tanto, mayor cantidad de nanopartículas sintetizadas. A concentraciones menores, si bien se produce un pico de máxima absorción, este es de menor intensidad y más ancho, indicando menor concentración de nanopartículas y mayor dispersión de tamaño. La

relación de cantidad de extracto de marco respecto a la cantidad de nitrato de plata es 1:10, relación que coincide con la mencionada por Moyo *et al.* [100].

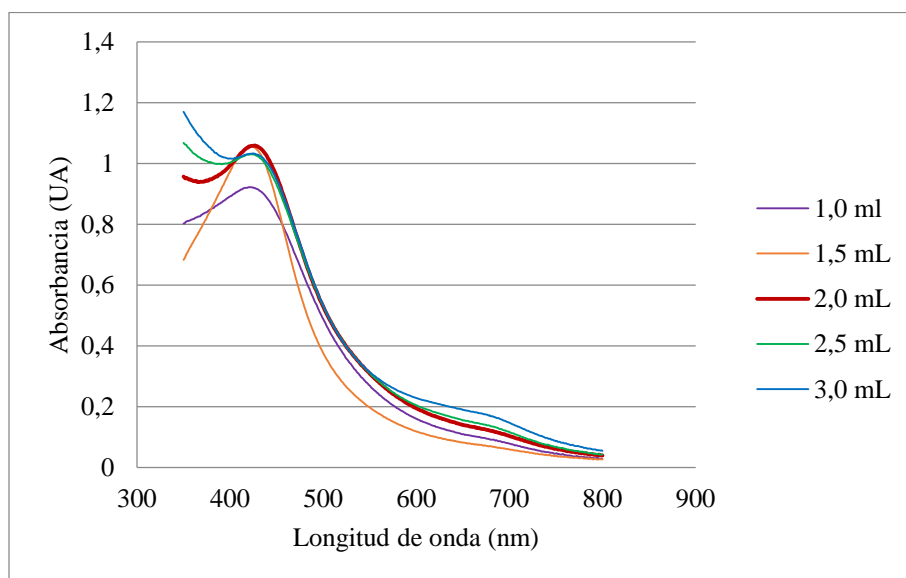


Figura 3.6. Espectros Visibles de nanopartículas de plata sintetizadas variando la cantidad de extracto

3.3.1.6. ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA

Una vez optimizada la síntesis, se realizaron los espectros UV-Vis de las nanopartículas para poder estimar un tamaño de partícula aproximado. En la Tabla 3.1 se muestran los valores de longitud de onda a la máxima absorbancia de cinco repeticiones de la síntesis.

Tabla 3.1. Valores de máxima absorbancia para las repeticiones de la síntesis de nanopartículas de plata

Síntesis	Longitud de onda (nm)	Absorbancia (UA)
1	414	0,819
2	421	0,851
3	412	0,807
4	415	0,893
5	415	0,817
Promedio	415	0,837
Desviación estándar	3,36	0,03
Desviación estándar relativa	0,81%	4,20%

El promedio de longitud de onda de absorbancia máxima es de 415 nm, este valor, según la descripción de Pradeep [101], corresponde a que el tamaño promedio de las nanopartículas sintetizadas con extracto de marco está entre 30 y 50 nm. Este valor será corroborado posteriormente con el análisis de Microscopía Electrónica de Barrido.

También se puede evidenciar por la forma del espectro (Figura 3.7) que existe una dispersión elevada del tamaño de partícula, ya que el pico es ancho pero simétrico. El ensanchamiento del pico también puede indicar que existen espacios amplios entre las

nanopartículas, es decir hay variabilidad de tamaños [102]. En el Anexo 2 se encuentran los espectros de las síntesis realizadas.

Las nanopartículas obtenidas fueron estables durante 30 días cuando permanecieron en refrigeración. Conservaron tanto el color marrón como el pico de absorbancia máxima durante este periodo.

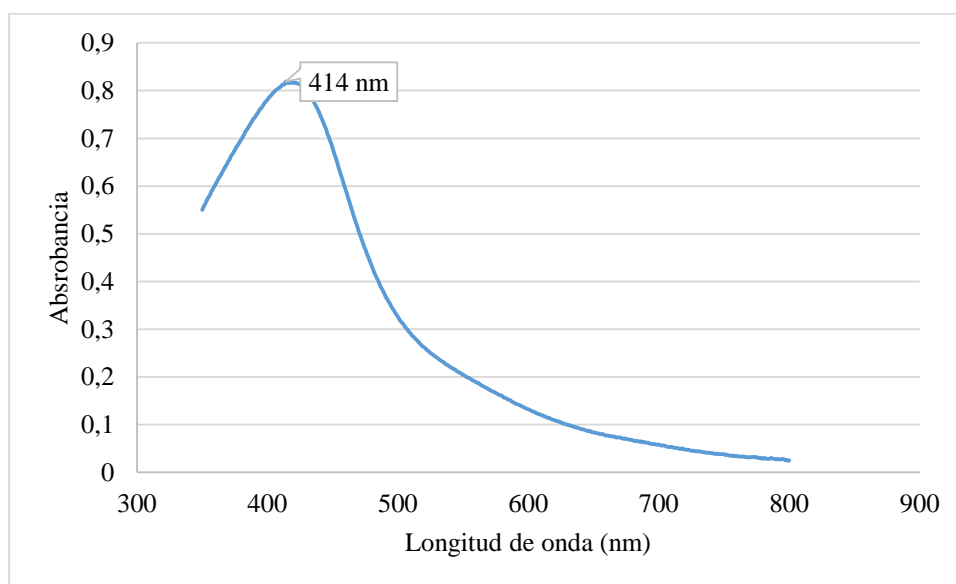


Figura 3.7. Ejemplo de espectro Visible de las nanopartículas de plata sintetizadas en condiciones óptimas

3.3.2. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJOS POR TRANSFORMADAS DE FOURIER

La Espectroscopia de Infrarrojos por Transformadas de Fourier (FTIR) se utilizó para verificar que las nanopartículas de plata se recubran con el extracto de marco utilizado para

la síntesis, ya que este no solo actúa como agente reductor, sino que el resto orgánico recubre o funcionaliza las nanopartículas. De esta manera, se pueden identificar los compuestos responsables de la reducción del nitrato de plata para formar nanopartículas. En la Figura 3.8. se comparan los espectros del nitrato de plata, el extracto de marco y las nanopartículas sintetizadas con extracto de marco.

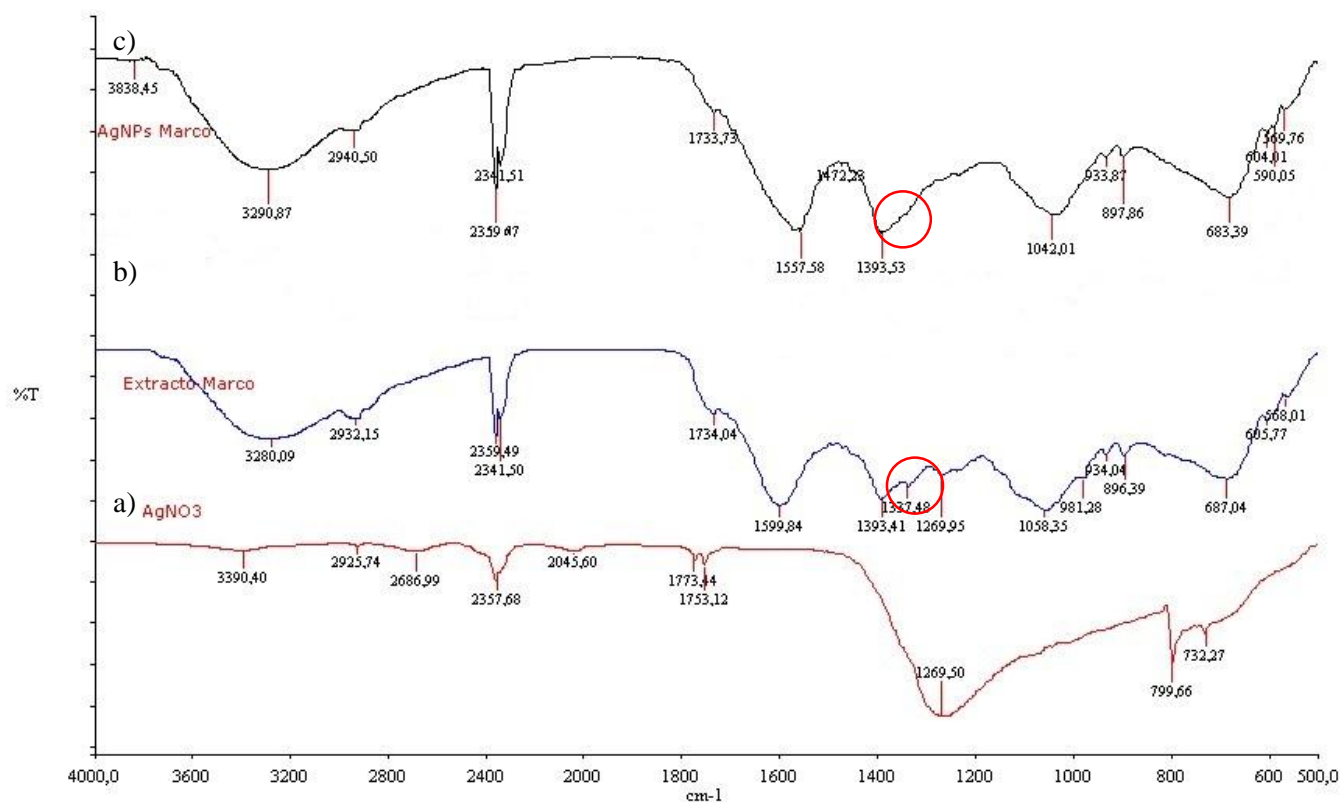


Figura 3.8. Espectros FTIR de: nitrato de plata (a), extracto de marco (b) y nanopartículas de plata sintetizadas con extracto de marco (c)

El espectro 3.8a correspondiente al nitrato de plata, se empleó como base para verificar la reducción del nitrato de plata. En este espectro se presentan bandas prominentes en 799,66 cm^{-1} y 1269,50 cm^{-1} que desaparecen posteriormente en el espectro de las nanopartículas. Las bandas mencionadas se asemejan a los resultados obtenidos por Pradhan [103].

La similitud entre los espectros de las nanopartículas sintetizadas y el extracto indica que el residuo orgánico del extracto se mantiene intacto. Bandas similares se presentan tanto en el espectro del extracto como en el espectro de las nanopartículas sintetizadas alrededor de 1570 cm^{-1} que corresponde al estiramiento del grupo C=C de los anillos aromáticos, además de una banda en 1050 cm^{-1} aproximadamente, característica del enlace C-O dentro de los alcoholes; datos que confirman el recubrimiento adecuado de las nanopartículas con el extracto; ya que este no solo cumple con la función de reductor, sino que también actúa como un medio estabilizante. De esta manera se ahorra el uso adicional de otros reactivos.

Existe una banda de absorción en 1337,47 cm^{-1} que se presenta en el espectro del extracto de marco (Figura 3.8b) y corresponde al enlace O-H dentro de los compuestos fenólicos [104]. En el espectro de las nanopartículas no se presenta esta banda, sin embargo, se mantiene la banda de alta intensidad alrededor de los 3280 cm^{-1} . Esta diferencia se debe a que los grupos OH⁻ de los compuestos fenólicos no reaccionan en su totalidad. Rais [105] indica que de cada cuatro grupos hidroxilo, solo uno reacciona, razón por la cual la banda de los grupos OH⁻ en los 3200 cm^{-1} no se ve afectado por la reacción. Los grupos hidroxilo

restantes se unen a las nanopartículas por atracción electrostática, recubriéndolas. La reacción propuesta donde se sintetizan nanopartículas de plata a partir de una sal de plata y pentaeritritol se presenta en la Figura 3.9.

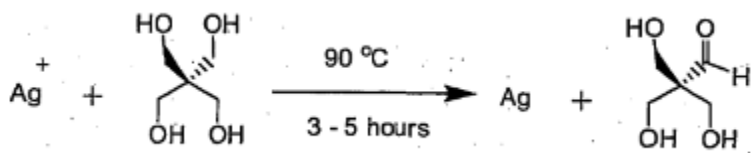


Figura 3.9. Reacción de síntesis de nanopartículas con pentaeritritol [105]

Adicionalmente, se realizó la prueba de cloruro férrico para determinar la presencia de polifenoles en el extracto y en las nanopartículas sintetizadas. Como se puede observar en la Figura 3.9, existe un cambio de coloración de la tonalidad del cloruro férrico que posee una coloración azul oscuro en el extracto y verde claro en las nanopartículas sintetizadas. Este ensayo corrobora la información obtenida por el espectro IR.

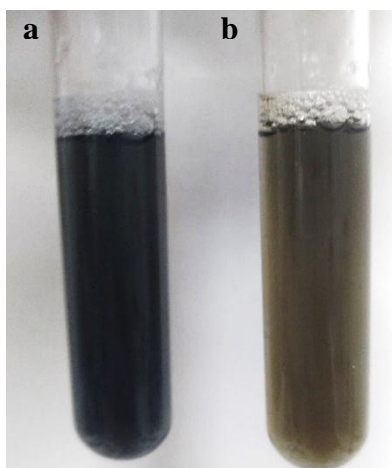


Figura 3.10. Prueba de cloruro férrico para polifenoles: extracto de marco (a) y nanopartículas sintetizadas (b)

3.3.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

La técnica SEM se empleó para confirmar el tamaño de partícula estimado por Espectroscopía UV-Vis. Además, se pudo determinar la morfología de las nanopartículas, así como su agregación y distribución de tamaño.

En la Figura 3.10 se puede observar la imagen SEM de las nanopartículas sintetizadas. El tamaño aproximado de partícula es de 63 nm, valor que difiere del tamaño estimado por Espectroscopía UV-Vis. Esta diferencia se debe a que en la Espectrofotometría UV-Vis el tamaño se asocia según el plasmón de resonancia de superficie de la nanopartículas, mientras que con microscopía SEM se observa la nanopartícula con el recubrimiento y como consecuencia aumenta su tamaño.

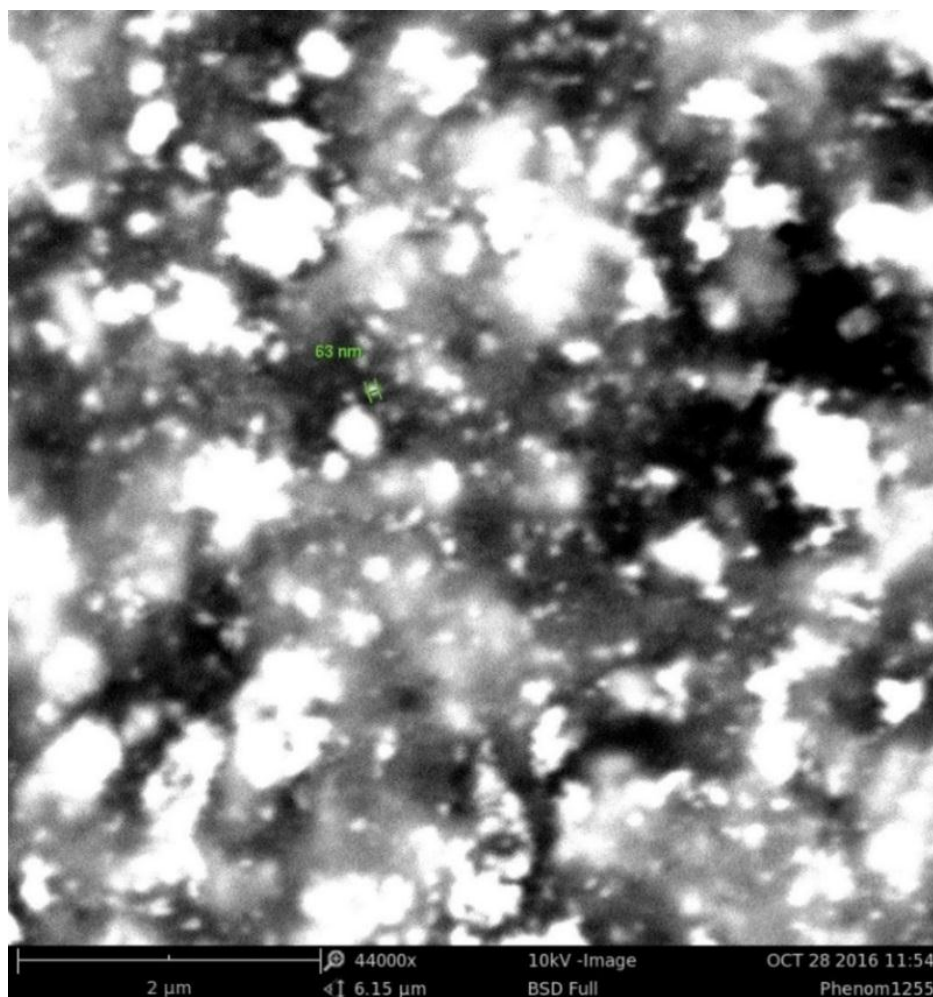


Figura 3.11. Imagen SEM de las nanopartículas sintetizadas

La forma de las nanopartículas de plata obtenidas es esférica, de superficie irregular y con gran variabilidad de tamaño, resultado que se corrobora con el pico ancho del análisis espectroscópico UV. También se observa cierta agregación.

Resultados similares en cuanto al tamaño de partícula reportaron Anandalakshmi *et al.* [106] y Kalainila *et al.* [107] con diámetros de 13 a 61 nm y 60 a 90 nm respectivamente. Ambos estudios se realizaron con extractos naturales cuyos componentes predominantes eran los polifenoles, razón por la cual se asemeja a la síntesis realizada con extracto de marco.

En la Figura 3.12 se puede observar el área en la que fue realizada la medición mediante el detector EDX del Microscopio Electrónico de Barrido. Se tomó un área y no un punto para que exista menor error, así como también se consideró tanto las nanopartículas aisladas como las aglomeradas.

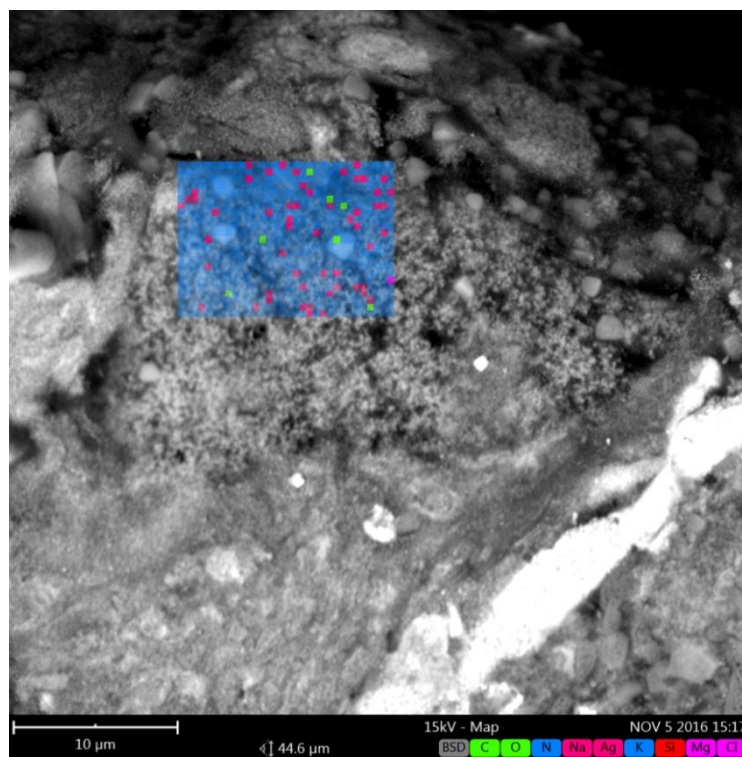


Figura 3.12. Imagen del área para el análisis elemental SEM-EDX

A continuación, en la Tabla 3.2, se presenta la tabla con los elementos y sus porcentajes dentro de la muestra

Tabla 3.2. Análisis elemental SEM-EDX de las nanopartículas sintetizadas

Elemento	Porcentaje (%)	Error (%)
C	41.5	0.01
O	36.7	0.01
N	15.2	0.01
Na	3.0	0.02
Ag	0.9	0.02
K	0.9	0.02
Si	0.8	0.03
Mg	0.7	0.05
Cl	0.3	0.05

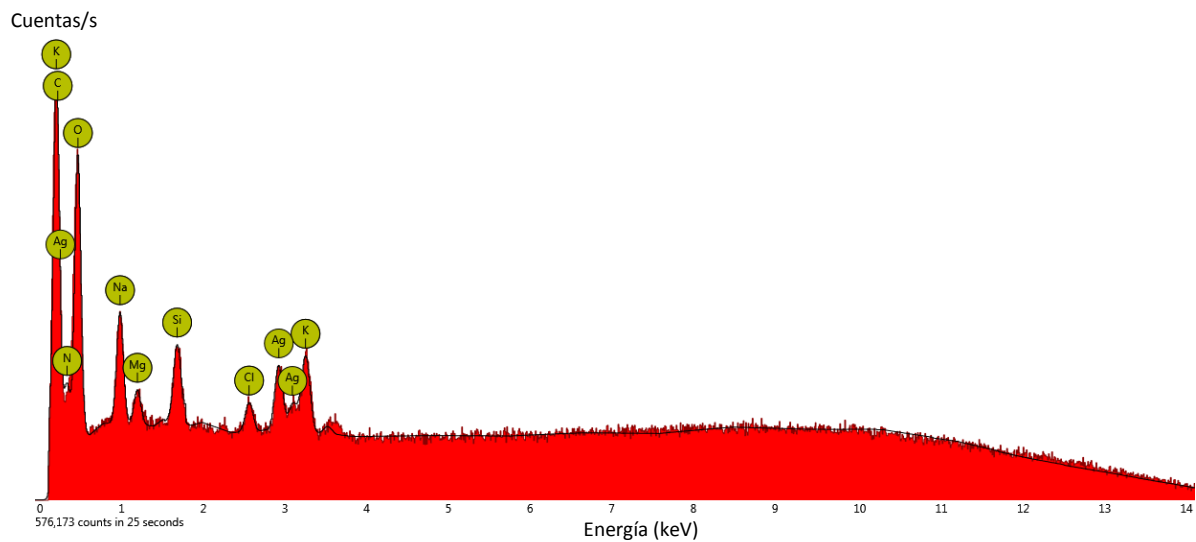


Figura 3.13. Espectro EDX de las nanopartículas sintetizadas

Existe un gran porcentaje de carbono, 41,5%, que se debe al recubrimiento del material orgánico del extracto acuoso de marco. Se evidencia también un gran porcentaje de nitrógeno (15.2%) que puede indicar existencia de nitratos provenientes de la sal precursora. De igual manera que el carbono, el aporte de nitrógeno puede deberse a restos del extracto acuoso. El 3% de sodio puede estar presente debido al hidróxido de sodio añadido para la regulación del pH de la síntesis. La plata se muestra en una proporción baja (0.9%), lo cual puede indicar que el elemento se encuentra recubierto por otros elementos del extracto, para ello se realizará la determinación del contenido de plata para verificar su presencia antes y después de la reacción. Existen otros elementos como potasio, cloro y magnesio que se pueden atribuir al extracto acuoso. La presencia de potasio se comprobó mediante Espectroscopía de Absorción Atómica de Llama donde se encontró 2,97 ppm de potasio en 1 mL de extracto de concentración 0,05g/L.

3.4. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA DE LLAMA

El extracto de marco y las nanopartículas sintetizadas se analizaron para verificar la concentración de plata antes y después de la síntesis. El contenido de plata en el extracto está debajo del límite de detección, por lo que se puede concluir que no influye en la cuantificación del contenido de las nanopartículas.

3.4.1. EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DEL MÉTODO

3.4.1.1. LINEALIDAD

La curva de calibración se realizó con el objetivo de verificar la linealidad del método. En la Figura 3.12 se presenta la curva de calibración junto con la ecuación de la recta y coeficiente de correlación correspondientes. El coeficiente de correlación es 0.999, cumpliendo el criterio de aceptación al ser mayor a 0.990.

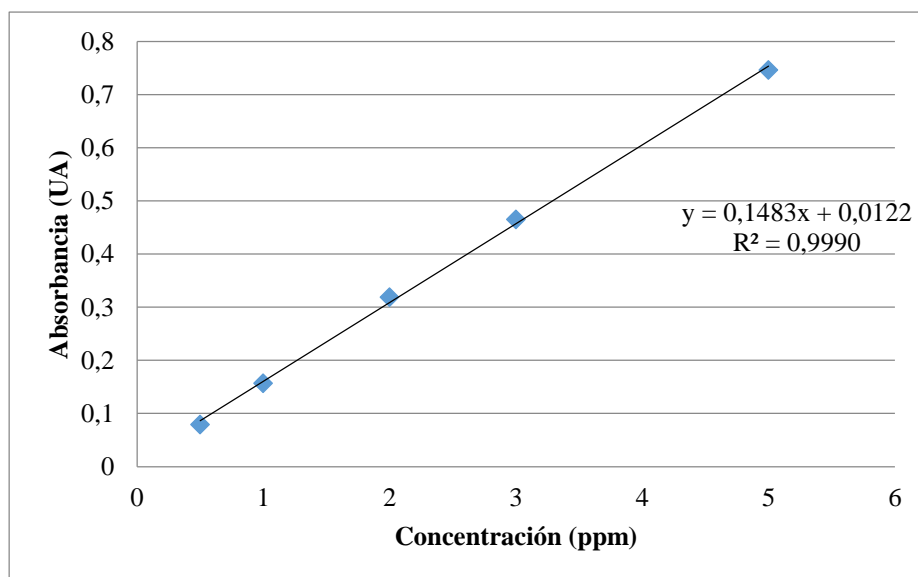


Figura 3.14. Curva de calibración para la cuantificación del contenido de plata de las nanopartículas

3.4.1.2. RECUPERACIÓN

Las fortificaciones se realizaron a 1,00 y 4,00 ppm para obtener el porcentaje de recuperación a un nivel bajo y un nivel alto dentro de la curva de calibración. Los resultados se muestran en la Tablas 3.3 y 3.4.

Tabla 3.3. Cálculo de porcentajes de recuperación para la fortificación de concentración 1,00 ppm

Repetición	Absorbancia (UA)	Concentración medida (ppm)	Porcentaje de recuperación (%)	Promedio (%)	Desviación estándar
1	0,154	0,956	95,62	95,84	1,03
2	0,153	0,949	94,94		
3	0,156	0,970	96,97		

**Tabla 3.4. Cálculo de porcentajes de recuperación para la fortificación de
concentración de 4,00 ppm**

Repetición	Absorbancia (UA)	Concentración medida (ppm)	Porcentaje de recuperación (%)	Promedio (%)	Desviación estándar
1	0,600	3,964	99,09	99,88	0,96
2	0,611	4,038	100,94		
3	0,603	3,984	99,60		

Como se puede observar en las tablas 3.4 y 3.5 se obtuvieron valores de 95,84% y 99,88% de recuperación para las fortificaciones de 1,00 y 4,00 ppm respectivamente. Estos valores otorgan exactitud al método ya que entran en el rango aceptable para bajas concentraciones, entre 90 y 110%.

3.4.1.3. LÍMITE DE DETECCIÓN Y DE CUANTIFICACIÓN

Se determinó el límite de cuantificación y detección a través de la medición de diez blancos. Los resultados se presentan en la tabla 3.5.

Tabla 3.5. Lecturas de absorbancia de los blancos y concentraciones calculadas para la determinación de LOD y LOQ

Blanco	Absorbancia (UA)	Concentración (ppm)
1	0,000	-0,065
2	0,000	-0,065
3	0,000	-0,065
4	0,001	-0,058
5	0,001	-0,058
6	0,001	-0,058
7	0,001	-0,058
8	0,002	-0,051
9	0,001	-0,058
10	0,001	-0,058
Promedio		-0,059
Desviación estándar		0,004
LOD		0,013
LOQ		0,043

3.4.2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PLATA DE LAS SÍNTESIS

El contenido de plata de la síntesis de nanopartículas de plata con extracto de marco se determinó con el fin de verificar que el contenido de plata no cambie y determinar el rendimiento de la reacción. Se tomó en cuenta la cantidad de plata teórica que se debería obtener en función de la cantidad de nitrato de plata en solución inicial y el volumen de extracto añadido. Los resultados se muestran en la Tabla 3.6 y los cálculos en el Anexo 2.

Tabla 3.6. Cálculo del rendimiento de la reacción

N°	Absorbancia (UA)	Concentración medida (ppm)	Factor de dilución	Concentración real (ppm)	Rendimiento (%)	Promedio (%)	Desviación estándar
1	0,147	0,909	100	90,90	92,69	92,52	1,17
2	0,145	0,895		89,55	91,32		
3	0,146	0,922		92,25	94,07		
4	0,149	0,902		90,22	92,00		

Como se puede observar en la Tabla 3.6 se obtuvo un promedio de concentración de 90,73 ppm de plata en las nanopartículas sintetizadas, comparado con 98,01 ppm iniciales presentes en el nitrato de plata. Esta cantidad de plata equivale a un rendimiento de la reacción del 92,52%, valor aceptable para síntesis a menor escala. En su tesis doctoral, Li [108] prueba diferentes fenoles y mezclas de fenoles como agentes reductores, y obtiene

rendimientos en el rango de 75 a 90%; en base a estos resultados, se puede concluir que el extracto de marco es un buen agente reductor, ya que el rendimiento de la reacción es alto.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES

La síntesis de nanopartículas de plata utilizando hojas de marco como agente reductor fue exitosa, demostrando la viabilidad del extracto. Se realizó la optimización de la síntesis a partir de un protocolo definido, logrando parámetros óptimos con 2 mL de extracto acuoso 0,05 g/mL, nitrato de plata 1,0 mM, pH 8 y 50°C durante 50 minutos.

Se obtuvieron nanopartículas recubiertas con extracto de tamaño promedio de 63 nm medidas por SEM y se observó variabilidad en los tamaños de partícula, así como agregación. Se estimó que por Espectroscopía UV-Vis el tamaño de la partícula se encuentra entre 30 y 50 nm. En el análisis SEM-EDX, el bajo contenido de plata (0,9%) confirma el apropiado recubrimiento intencional de las nanopartículas con el extracto de la planta de marco.

La espectroscopía de Infrarrojos con Transformadas de Fourier (FTIR) mostró bandas características del grupo funcional -OH, característica presente en los polifenoles del

extracto acuoso de la planta de marco. La similitud del espectro IR del extracto y las nanopartículas sintetizadas sugiere un adecuado recubrimiento, y la desaparición de una única banda a 1337.48 cm^{-1} confirma el recubrimiento por atracción electrostática.

Para comprobar la presencia del elemento y determinar el rendimiento de la reacción de síntesis, el análisis por Espectrofotometría de Absorción Atómica de Llama determinó que la concentración de plata inicial en la solución de nitrato de plata fue de 98,01 ppm y de 90,73 ppm en la solución coloidal de nanopartículas de plata, equivalente a un rendimiento del 92.52%.

4.2. RECOMENDACIONES

Se sugiere probar métodos alternativos para el secado de las nanopartículas para el análisis por FTIR y SEM, como por ejemplo liofilización, para evitar la aglomeración de las nanopartículas y obtener mejores resultados.

El análisis con otras técnicas permitiría obtener información complementaria de las nanopartículas sintetizadas. Así, se sugiere el uso de: Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM, siglas en inglés), Microscopio de Fuerza Atómica (AFM, siglas en inglés) o Microscopio de Efecto Túnel (STM, siglas en inglés), para obtener el tamaño exacto del núcleo metálico de plata, y Dispersión Dinámica de Luz (DLS, siglas en inglés)

para determinar el espesor del recubrimiento orgánico del extracto de marco sobre las nanopartículas.

Se sugiere que para determinar el compuesto responsable de la reducción se realice una separación cromatográfica y posteriormente un análisis por Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN, por sus siglas en inglés).

BIBLIOGRAFÍA

- [1]. Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B. y Ikram, S. (2016). A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. *Journal of Advanced Research*, 7(1), pp.17-28.
- [2]. Camacho, J. y Deschamps, L. (2013). Síntesis de nanopartículas de plata y modificación con pulpa de papel para aplicación antimicrobial (tesis de pregrado). Universidad de Cartagena, Colombia.
- [3]. Belmares, S., Torres, E., Coparín, J., Arriaga, J. y Elizondo, N. (2013). Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro, plata y fierro por el método de fisicoquímica verde. *3er Foro de Divulgación Científica y Tecnológica*, México.
- [4]. Vijay Kumar, P., Pammi, S., Kollu, P., Satyanarayana, K. y Shameem, U. (2014). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Boerhaavia diffusa* plant extract and their antibacterial activity. *Industrial Crops and Products*, 52 (2), pp.562-566.
- [5]. Binns, C. (2010). *Introduction to Nanoscience and Nanotechnology*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- [6]. Hornyak, G., Tibbals, H., Dutta, J. y Moore, J. (2008). *Introduction to Nanoscience*. Boca Raton: CRC Press.
- [7]. Poole, C. y Owens, F. (2003). *Introduction to Nanotechnology*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.

- [8]. Ramsden, J. (2016). *Nanotechnology: An Introduction*. Oxford: Elsevier.
- [9]. Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B. y Ikram, S. (2016). A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. *Journal of Advanced Research*, 7(1), pp.17-28.
- [10]. Sobolev, K. y Ferrada, M. (2005). How Nanotechnology Can Change the Concrete World. *American Ceramic Society Bulletin*, 84(10), pp. 14-18.
- [11]. Silva, G. (2004). Introduction to Nanotechnology and its applications to medicine. *Surgical Neurology*, 61(3), pp.216-220.
- [12]. Mijatovic, D., Eijkel, J. y Van den Berg, A. (2005). Technologies for nanofluidic systems: top-down vs. bottom-up—a review. *Lab on a Chip*, 5(5), p.492.
- [13]. Torres, T. (2002). Nanoquímica y Nanotecnología: Nuevos materiales, polímeros y máquinas moleculares. *Encuentros multidisciplinares*, 4(12)., pp. 20-25.
- [14]. Monge, M. (2009). Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. *Anales de Química*. 105(1), pp, 33-41.
- [15]. Olderburg, S. (N/D). Silver Nanoparticles: Properties and Applications. <http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/nanomaterials/silver-nanoparticles.html>, 24 de julio de 2016.

- [16]. Tran, Q., Nguyen, V., y Le, A. (2013). Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 4(3), 033001.
- [17]. Arakelyan, S., Veiko, V., Kutrovskaya, S., Kucherik, A., Osipov, A., Vartanyan, T. y Itina, T. (2016). Reliable and well-controlled synthesis of noble metal nanoparticles by continuous wave laser ablation in different liquids for deposition of thin films with variable optical properties. *Journal of Nanoparticle Research*, 18(6).
- [18]. Lara, H., Garza-Treviño, E., Ixtapan-Turrent, L. y Singh, D. (2011). Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. *Journal of Nanobiotechnology*, 9(1), p.30.
- [19]. Rai, M., Yadav, A. y Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 27(1), pp.76-83.
- [20]. Pal, S., Tak, Y. y Song, J. (2007). Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), pp.1712-1720.
- [21]. Lara, H., Ayala-Núñez, N., Ixtapan-Turrent, L. y Rodríguez-Padilla, C. (2010). Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. *Journal of Nanobiotechnology*, 8(1), p.1.

- [22]. Gulrajani, M., Gupta, D., Periyasamy, S. y Muthu, S. (2008). Preparation and application of silver nanoparticles on silk for imparting antimicrobial properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 108(1), pp.614-623.
- [23]. Zhang, H. (2013). *Application of Silver Nanoparticles in Drinking Water Purification*. (Disertación de Doctorado en Ingeniería Civil y Ambiental). Universidad de Rhode Island, Estados Unidos.
- [24]. Patel, A., Li, S., Wang, C., Zhang, W. y Wei, Y. (2007). Electrospinning of Porous Silica Nanofibers Containing Silver Nanoparticles for Catalytic Applications. *Chemistry of Materials*, 19(6), pp.1231-1238.
- [25]. Sivakumar, P., Sivakumar, P., Anbarasu, K., Pandian, K. y Renganathan, S. (2013). Synthesis of Silver Nanorods from Food Industrial Waste and Their Application in Improving the Keeping Quality of Milk. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 52(49), pp.17676-17681.
- [26]. Ávalos, A., Haza, A. y Morales, P. (2013). Nanopartículas de plata: aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 7(2), pp. 1-23.
- [27]. Johnston, H., Hutchison, G., Christensen, F., Peters, S., Hankin, S. y Stone, V. (2010). A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: Particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, 40(4), pp.328-346.

- [28]. Takenaka, S, Karg, E, Roth, C, Schulz, H, Ziesenis, A, Heinzmann, U, Schramel, P y Heyder J. (2001). Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. *Environ Health Perspect.* 4(1), pp. 547-551.
- [29]. Vela, L. (2012). Determinación del potencial genotóxico de las nanopartículas de plata mediante el análisis del ciclo celular, la apoptosis y el ensayo del cometa en la línea celular beas-2b. (Memoria de Maestría en Genética Avanzada). Universidad Autónoma de Barcelona, España.
- [30]. Maneewattanapinyo, P., Banlunara, W., Thammacharoen, C., Ekgasit, S. y Kaewamatawong, T. (2011). An Evaluation of Acute Toxicity of Colloidal Silver Nanoparticles. *Journal of Veterinary Medical Science*, 73(11), 1417-1423.
- [31]. Elkhawass, E., Mohallal, M., y Soliman, M. (2015). Acute Toxicity of Different Sizes of Silver Nanoparticles Intraperitoneally injected in Balb/C Mice Using Two Toxicological Methods. *International Journey of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(2), 94-99.
- [32]. Kramer, J., Bell, R., Smith, S. y Gorsuch, J. (2009). Silver Nanoparticle Toxicity and Biocides: Need for Chemical Speciation. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 5(1), pp. 720-722.
- [33]. Frutos, A. y Casasolas, A. (2015). Nanopartículas de plata en envases de uso alimentario. *Revista de Salud Ambiental*, 15(2), pp. 80-87.

- [34]. Hartemann, P., Hoet, P., Proykova, A., Fernandes, T., Baun, A., De Jong, W., Wijnhoven, S. (2015). Nanosilver: Safety, health and environmental effects and role in antimicrobial resistance. *Materials Today*, 18(3), pp.122-123.
- [35]. Zanella, R. (2012). Metodologías para síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. *Mundo Nano*, 5(1), pp. 1-13.
- [36]. Mubayi, A., Chatterji, S., Rai, P. y Watal, G. (2012). Evidence bases green synthesis of nanoparticles. *Advanced Materials Letters*, 3(6), pp. 519-525.
- [37]. Iravani, S. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*, 13(10), p.2638-2650.
- [38]. Banerjee, P., Satapathy, M., Mukhopahayay, A. y Das, P. (2014). Leaf extract mediated green synthesis of silver nanoparticles from widely available Indian plants: synthesis, characterization, antimicrobial property and toxicity analysis. *Bioresour. Bioprocess.*, 1(1).
- [39]. *Ambrosía arborescens mill.* Plantas Nativas de la Hoya de Quito. <http://plantasnativas.visitavirtualjbq.com/index.php/epoca/xviii-joseph-de-jussieu/8-ambrosia-arborescens>, 24 de julio de 2016.
- [40]. Cano, T. (2014). Caracterización de una espirolactona sesquiterpénica α -metilénica obtenida de *Ambrosia arborescens miller* y evaluación de su actividad biológica en *Tripanosoma cruzi*. *Revista Sociedad Química Perú* 80(2), pp.124-135.

- [41]. De Leo, M., Saltos, M., Puente, B., De Tommasi, N. y Braca, A. (2010). Sesquiterpenes and diterpenes from *Ambrosia arborescens*. *Phytochemistry*, 71(7), pp.804-809.
- [42]. Ibarra, M. and Paredes, E. (2013). Eficacia antibacteriana *in vitro* de marco (*Ambrosia arborescens* mill) y Paico (*Chenopodium ambrosioides* L) en una formulación cosmética, (tesis de pregrado). Universidad Politécnica Salesiana, Ecuador.
- [43]. Vera, M. (2008). Estudio fitoquímico de una planta de la flora del Ecuador: *Ambrosia arborescens*. (Tesis de pregrado). Universidad Politécnica del Ejército.
- [44]. Cruz, P. (2009). Elaboración y control de calidad del gel antimicótico de manzanilla (*Matricaria chamomilla*), matico (*Aristiguietia glutinosa*) y marco (*Ambrosia arborescens*) para neo-fármaco, (tesis de grado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador
- [45]. Ahmed, S. y Ikram, S. (2015). Silver Nanoparticles: One Pot Green Synthesis Using *Terminalia arjuna* Extract for biological application. *Journal of Nanomedicine and Nanotechnology*, 06(04), pp. 1-6.
- [46]. Shahverdi, A., Fakhimi, A., Shahverdi, H. y Minaian, S. (2007). Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3(2), pp.168-171.
- [47]. Ahuja, S. y Jespersen, N. (2006). *Modern instrumental analysis*. Amsterdam: Elsevier.

- [48]. Sierra, I., Pérez, D., Gómez, S. y Morante, S. (2010). *Análisis Instrumental*. España: Netbiblo, pp.36-47.
- [49]. Valladares, S. (2004). Espectrofotometría de absorción molecular ultravioleta-visible. En E. Castro, *Control de Calidad de Insumos y Dietas Acuícolas*. México D.F.: FAO. Recuperado de <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab482s/AB482S00.htm#TOC>.
- [50]. Litter, M., Armienta, M. y Farias, S. (2009). *Metodologías analíticas para la determinación y especiación de arsénico en aguas y suelos*. Argentina: CYTED, pp.43-51.
- [51]. Sogorb, M. (n.d.). *Instrumentos ópticos en medidas de absorbancia*. [online] Repositorio.innovacionumh.es. Recuperado 28 agosto 2016, de http://repositorio.innovacionumh.es/Proyectos/P_22CursoMateriales/Miguel_Angel_Sogorb/Wimba/Espectroscopia_04.htm.
- [52]. Owen, T. (2000). Fundamentos de la Espectroscopia UV-Vis moderna. *Agilent Technologies*, pp.32-55. Recuperado de <http://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5980-1397ES.pdf>.
- [53]. Skoog, D. y West, D. (1990). *Análisis Instrumental* (5ta ed). México: McGraw-Hill Interamerican.
- [54]. Olsen, E. (1990). *Métodos ópticos de análisis*. Barcelona: Reverté, pp. 165-171.
- [55]. Harris, D. (2001). *Análisis químico cuantitativo* (3era ed). Barcelona: Reverté, pp. 413-419.

- [56]. Robinson, K., Robinson, J., Larrauri Ros, L. y Madrid Albarrán, Y. (2001). *Análisis Instrumental*. Madrid: Prentice Hall, pp. 446-455.
- [57]. Mayorga, O. (2016). *Estructura de Macromoléculas*. Departamento de Química Física de la Universidad de Granada. pp. 172-199. Recuperado de http://quimicafisica.ugr.es/pages/docencia/estructura_macromoleculas?theme=pdf.
- [58]. Siesler, H. (2002). *Near-infrared spectroscopy*. Weinheim: Wiley-VCH, pp. 3-10.
- [59]. Bakeev, K. (2005). *Process analytical technology* (Segunda Edición). Oxford: Blackwell, pp. 107-120.
- [60]. *Advantages of a Fourier Transform Infrared Spectrometer*. Thermofischer Technical Notes 50674. Recuperado de <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TN50674-E-0215M-FT-IR-Advantages.pdf>.
- [61]. Hernández, A., Plaza, E. y Villegas, R. (2006). *Espectrofotómetro Infrarrojo*. Presentación, México. Recuperado de <https://es.scribd.com/doc/29033866/INSTRUMENTACION-INFRARROJO>
- [62]. Bar, H., Bhui, D., Sahoo, G., Sarkar, P., De, S., y Misra, A. (2009). Green synthesis of silver nanoparticles using latex of *Jatropha curcas*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 339(1-3), 134-139.
- [63]. Ipohorski, M. (2011). *Una Mirada al Microscopio Electrónico de Barrido*. Instituto de Energía y Desarrollo Sustentable, Buenos Aires. Recuperado de

http://www.cab.cnea.gov.ar/ieds/images/extras/hojitas_conocimiento/materiales/51_52_ipo_horski_microscopio_elect.pdf.

[64]. Vázquez, G. y Echeverría, O. (2000). *Introducción a la Microscopía Electrónica aplicada a las Ciencias Biológicas*. México: Fondo de Cultura Económica, pp. 92-103.

[65]. (S/D). Apuntes de Microscopía Electrónica, Laboratorio de Microscopía Electrónica, Universidad Autónoma de Madrid. Recuperado de <http://microscopiaelectronicauami.com/sites/default/files/apuntes/uami.pdf>

[66]. Lozano, V., Yañez, M. y Morales, A. (2014). *Principios y Práctica de Microscopía Electrónica*. Buenos Aires: Bahía Blanca.

[67]. Ribadenerira, D. (2008). *Microscopía Electrónica: Fundamentos, Teoría y Aplicaciones*. (Tesis de maestría). Escuela Politécnica Nacional, Ecuador.

[68]. Naik, A. (2009). Fundamentos del microscopio electrónico y su aplicación en la investigación textil. Recuperado de <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099/6074/Article03.pdf>.

[69]. Scanning Electron Microscope. Recuperado el 24 de julio de 2016, de <https://www.purdue.edu/ehps/rem/rs/sem.htm>.

[70]. Korbekandi, H., Asghari, G., Chitsazi, M., Bahri Najafi, R., Badii, A., y Iravani, S. (2014). Green biosynthesis of silver nanoparticles using *Althaea officinalis* radix hydroalcoholic extract. *Artificial Cells, Nanomedicine, And Biotechnology*, 44(1), 209-215.

- [71]. Razmilic, B. (2004). Espectroscopía de Absorción Atómica. En E. Castro, *Control de Calidad de Insumos y Dietas Acuicolas*. México D.F.: FAO. Recuperado de <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab482s/AB482S00.htm#TOC>.
- [72]. Robinson, J. (1996). *Atomic spectroscopy*. New York: Marcel Dekker, pp. 65-80.
- [73]. Beaty, R. y Kerber, J. (1993). *Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absortion Spectrophotometry*. (Segunda Edición). Estados Unidos: The Perkin-Elmer Corporation.
- [74]. Van Loon, J. (1980). *Analytical atomic absorption spectroscopy*. New York: Academic Press.
- [75]. Walton, H. y Reyes, J. (1978). *Análisis químico e instrumental moderno*. Barcelona: Reverté, pp. 243-250.
- [76]. Zettner, A. (1999). *Principles and Applications of Absorption Spectroscopy*. New Haven: Clinical Laboratories.
- [77]. Levinson, R. (N/D). *Atomic absorption spectrometry*. Royal Society of Chemistry, Londres.
- [78]. Vinagre, J. (1997). Calidad de Métodos Analíticos. En C. Morón, *Producción y Manejo de Datos de Composición Química de Alimentos en Nutrición*. Santiago de Chile. Recuperado de <http://www.fao.org/docrep/010/ah833s/AH833S00.htm#Contents>.

- [79]. *Directrices para la validación de métodos analíticos*. (2010). New York: Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito. Recuperado de https://www.unodc.org/documents/scientific/Validation_Manual_STNAR41_Ebook_S.pdf.
- [80]. *Analytical Procedures and Methods Validation for Drug and Biologics*. (2015). Food and Drug Administration. Recuperado de <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm386366.pdf>.
- [81]. Ministerio de Salud. (2012). *Guía de Validación de Métodos*. Costa Rica. Recuperado de <https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/biblioteca-de-archivos/tramites/registro-de-productos-de-interes-sanitario/medicamentos-1/documentos-de-interes-3/guias-de-registro-medicamentos/2472-guia-de-validacion-de-metodos-analiticos/file>.
- [82]. Instituto de Salud Pública de Chile. (2010). *Validación de métodos y determinación de incertidumbre*. Santiago de Chile. Recuperado de http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/12/Guia%20T%C3%A9cnica%201%20validaci%C3%B3n%20de%20M%C3%A9todos%20y%20determinaci%C3%B3n%20de%20la%20incertidumbre%20de%20la%20medici%C3%B3n_1.pdf.
- [83]. Huber, L. (N/D). *Validation of Analytical Methods*. Agilent Technologies. Recuperado de <https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5990-5140EN.pdf>.
- [84]. Wood, R. (1999). How to validate analytical methods. *Trac Trends In Analytical Chemistry*, 18(9-10), 624-632.

- [85]. Rodríguez-León, E., Iñiguez-Palomares, R., Navarro, R., Herrera-Urbina, R., Tánori, J., Iñiguez-Palomares, C. y Maldonado, A. (2013). Synthesis of silver nanoparticles using reducing agents obtained from natural sources (*Rumex hymenosepalus* extracts). *Nanoscale Res Lett*, 8(1), p.318.
- [86]. Mansouri, S. y Ghader, S. (2009). Experimental study on effect of different parameters on size and shape of triangular silver nanoparticles prepared by a simple and rapid method in aqueous solution. *Arabian Journal of Chemistry*, 2(1), 47-53.
- [87]. Vanaja, M. Annadurai, G. (2012). *Coleus aromaticus* leaf extract mediated synthesis of silver nanoparticles and its bactericidal activity. *Applied Nanoscience*, 3(3), 217-223.
- [88]. Desai, R., Mankad, V., Gupta, S., y Jha, P. (2012). Size Distribution of Silver Nanoparticles: UV-Visible Spectroscopic Assessment. *Nanoscience and Nanotechnology Letters*, 4(1), 30-34.
- [89]. Verma, A. y Mehata, M. (2016). Controllable synthesis of silver nanoparticles using Neem leaves and their antimicrobial activity. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 9(1), 109-115.
- [90]. El-Kemary, M., El-Seedi, H., Zahran, M., y Khalifa, S. (2016). Spectral characterization of the silver nanoparticles biosynthesized using *Ambrosia maritima* plant. *Micro & Nano Letters*, 11(6), 311-314.
- [91]. *Uv/Vis/Ir Spectroscopy Analysis of Nanoparticles*. (2012). San Diego. Publicado por nanoComposix. Recuperado de

<http://50.87.149.212/sites/default/files/nanoComposix%20Guidelines%20for%20UV-vis%20Analysis.pdf>.

[92]. Velmurugan, P., Cho, M., Lee, S., Park, J., Bae, S., y Oh, B. (2014). Antimicrobial fabrication of cotton fabric and leather using green-synthesized nanosilver. *Carbohydrate Polymers*, 106, 319-325.

[93]. Ijaz Hussain, J., Kumar, S., Adil Hashmi, A., y Khan, Z. (2011). Silver Nanoparticles: Preparation, Characterization, And Kinetics. *Advanced Materials Letters*, 2(3), 188-194.

[94]. Traiwatcharanon, P., Timsorn, K., & Wongchoosuk, C. (2015). Effect of pH on the Green Synthesis of Silver Nanoparticles through Reduction with *Pistiastratiotes L.* Extract. *AMR*, 1131, 223-226.

[95]. Alqadi, M., Abo Noqtah, O., Alzoubi, F., Alzouby, J., y Aljarrah, K. (2014). pH effect on the aggregation of silver nanoparticles synthesized by chemical reduction. *Materials Science-Poland*, 32(1), 107-111.

[96]. Singh, M., Sinha, I., y Mandal, R. (2009). Role of pH in the green synthesis of silver nanoparticles. *Materials Letters*, 63(3-4), 425-427.

[97]. Heydari, R. y Rashidipour, M. (2015). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Extract of Oak Fruit Hull (Jaft): Synthesis and In Vitro Cytotoxic Effect on MCF-7 Cells. *International Journal of Breast Cancer*, 2015, 1-6.

[98]. Sumi Maria, B., Devadiga, A., Shetty Kodialbail, V., y Saidutta, M. (2014). Synthesis of silver nanoparticles using medicinal *Zizyphus xylopyrus* bark extract. *Applied Nanoscience*, 5(6), 755-762.

- [99]. Ibrahim, H. (2015). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using banana peel extract and their antimicrobial activity against representative microorganisms. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 8(3), 265-275.
- [100]. Moyo, M., Gomba, M., y Nharingo, T. (2015). Afzelia quanzensis bark extract for green synthesis of silver nanoparticles and study of their antibacterial activity. *International Journal of Industrial Chemistry*, 6(4), 329-338.
- [101]. Pradeep, T. (2012). *A Textbook of Nanoscience and Nanotechnology*. McGraw Hill, Nueva Delhi, pp 887 – 893.
- [102]. Aguilar, M. (2009). *Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata: Efecto sobre Collectotrichum gloesporioides* (Tesis de Doctorado). Instituto Politécnico Nacional de México.
- [103]. Pradhan, S. (2013). *Comparative analysis of Silver Nanoparticles prepared from Different Plant extracts (Hibiscus rosa sinensis, Moringa oleifera, Acorus calamus, Cucurbita maxima, Azadirachta indica) through green synthesis method* (Tesis de Masterado). National Institute of Technology, Rourkela.
- [104]. Trifunshi, S., Munteanu, M., Agotici, V., Pintea, S., y Gligor, R. (2015). Determination of Flavonoid and Polyphenol Compounds in *Viscum Album* and *Allium Sativum* Extracts. *International Current Pharmaceutical Journal*, 4(5).
- [105]. Rais, M. (2012). Preparation of silver nanoparticles. Patente N°: WO2012074355 A1. Recuperado de <https://www.google.com/patents/WO2012074355A1?cl=en>.

- [106]. Anandalakshmi, K., Venugobal, J., y Ramasamy, V. (2015). Characterization of silver nanoparticles by green synthesis method using *Pedaliium murex* leaf extract and their antibacterial activity. *Applied Nanoscience*, 6(3), 399-408.
- [107]. Kalainila, Subha, V., Ernest, R., y Renganathan, R. (2014). Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles from *Erythrina indica*. *Asian Journal of Pharmaceutical And Clinical Research*, 7(2), 39-43.
- [108]. Li, V. (2014). *Advancing silver nanostructures towards antibacterial applications* (Tesis de Doctorado). Royal Melbourne Institute of Technology.

ANEXOS

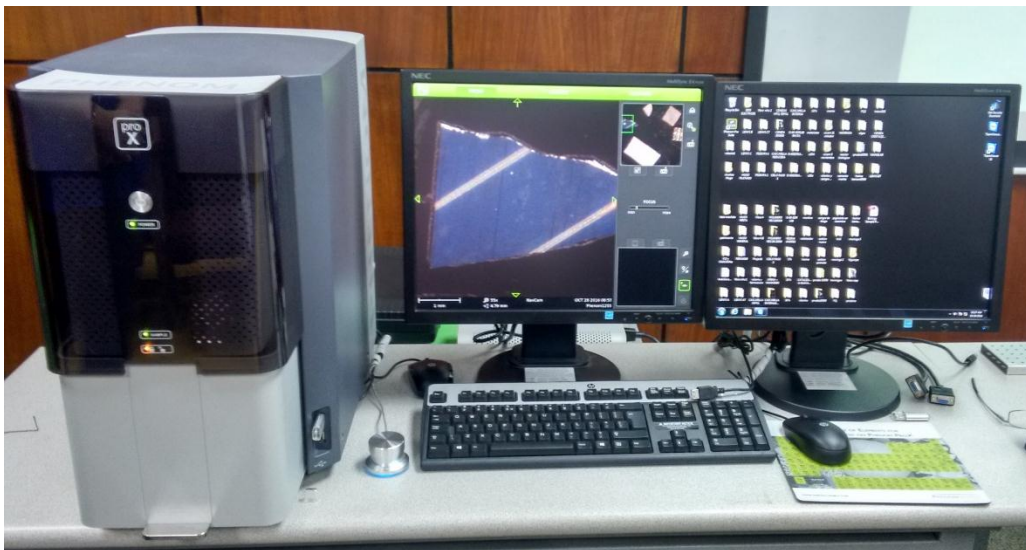
Anexo 1. Equipos utilizados en la caracterización de las nanopartículas



Espectrofotómetro UV-Vis Agilent



Espectrómetro FTIR-ATR Perkin Elmer

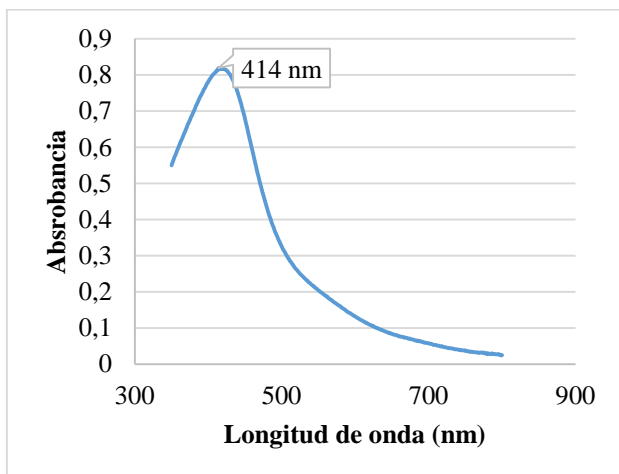


Microscopio Electrónico de Barrido Phenom X

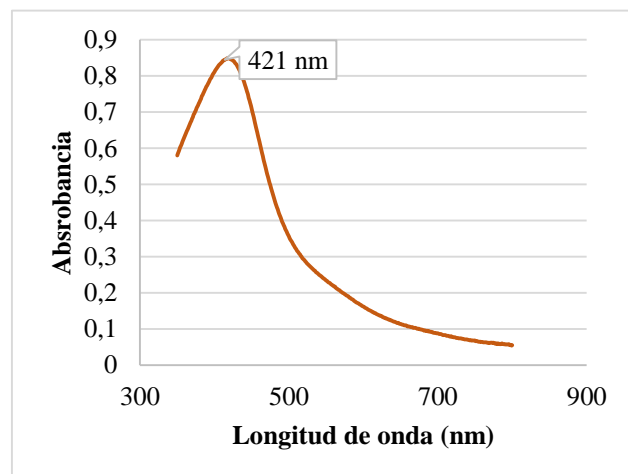


Espectrofotómetro de Absorción Atómica Perkin Elmer

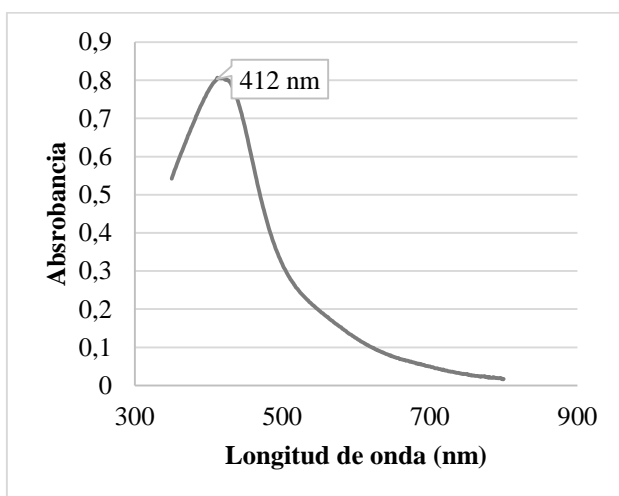
Anexo 2. Espectros Visibles de las síntesis optimizadas de nanopartículas de plata



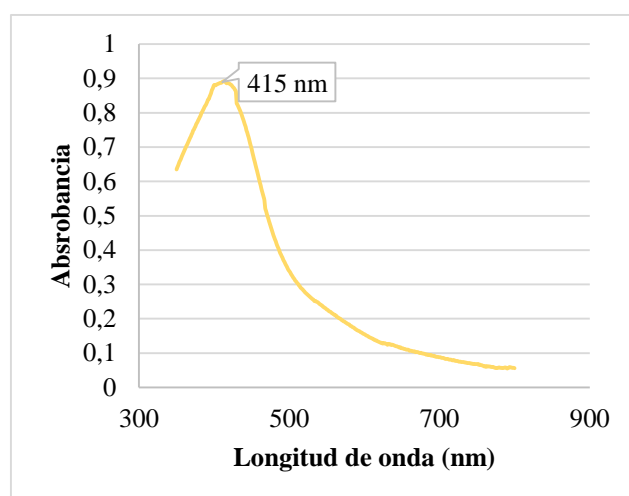
Síntesis 1



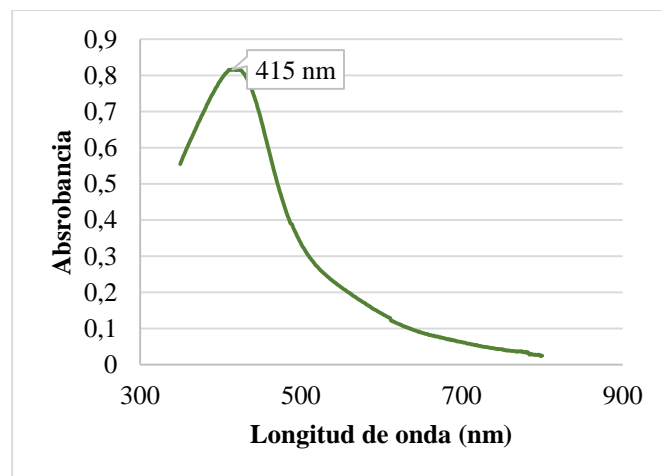
Síntesis 2



Síntesis 3



Síntesis 4



Síntesis 5

Anexo 3. Cálculo del rendimiento de la reacción química de síntesis de nanopartículas

10 mL de AgNO_3 + 2 mL de extracto de marco

$$1000 \text{ mL de } \text{AgNO}_3 \rightarrow 1 \text{ mM}$$

$$20 \text{ mL de } \text{AgNO}_3 \rightarrow x$$

$$x = 0,02 \text{ mM}$$

$$1 \text{ mmol } \text{AgNO}_3 \rightarrow 169,87 \text{ mg}$$

$$0,02 \text{ mmol} \rightarrow x$$

$$x = 3,3974 \text{ mg } \text{AgNO}_3$$

$$169,87 \text{ mg } \text{AgNO}_3 \rightarrow 107,87 \text{ mg Ag}$$

$$3,3974 \text{ mg } \text{AgNO}_3 \rightarrow x$$

$$x = 2,1574 \text{ mg Ag}$$

$$22 \text{ mL} \rightarrow 2,1563 \text{ mg}$$

$$1000 \text{ mL} \rightarrow x$$

$$x = 98,0636 \text{ ppm}$$

$$98,0636 \text{ ppm} \rightarrow 100\%$$

$$90,7283 \text{ mL} \rightarrow x$$

$$x = 92,52\%$$

PARA GRADOS ACADÉMICOS DE LICENCIADOS (TERCER NIVEL)

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Flavia Natalia Domenech Gordillo, C.I. 1721353744, autora del trabajo de graduación titulado: “Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata usando extracto de hojas de *Ambrosia arborescens* (marco) como reductor químico”, previa a la obtención del grado académico de LICENCIADA EN CIENCIAS QUÍMICAS CON MENCIÓN EN QUÍMICA ANALÍTICA en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos del autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Quito, 10 de enero de 2017

Srta. Flavia Natalia Domenech Gordillo

C.I. 1721353744